

doi:10.14753/SE.2013.1835

# Mac-1 (CD11b/CD18) adhéziós integrin a monocita-trombocita kapcsolatokban

Doktori értekezés

**dr. Patkó Zsófia Panna**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Acsády György egyetemi tanár, D.Sc.  
Dr. Császár Albert egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Szijártó Attila egyetemi adjunktus, Ph.D.  
Dr. Farkas Katalin főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szollár Lajos egyetemi tanár, D.Sc.  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pécsvárady Zsolt egyetemi tanár, Ph.D.  
Dr. Járai Zoltán egyetemi docens, Ph.D.

Budapest

2012

# Tartalomjegyzék

|  |    |
|--|----|
| 1. BEVEZETÉS   | 1  |
| 1.1 Az érlemeszesedés pathogenezeise   | 1  |
| 1.1.1 Fizikai eltérések  | 3  |
| 1.1.2 Endotheldiszfunkció  | 4  |
| 1.1.3. Hipertónia  | 6  |
| 1.1.4 Anyagcsere eltérések   | 7  |
| 1.1.5. Dohányzás   | 13 |
| 1.1.6 Életmód, diéta   | 14 |
| 1.1.7 Leukociták   | 17 |
| 1.1.8 Trombociták  | 19 |
| 1.1.9 A CD40 ligand  | 24 |
| 1.2 Monocita - trombocita komplexek és jelentőségük az érlemeszesedésben     | 26 |
| 1.3 P-selectin   | 30 |
| 1.4 A Mac-1 integrin   | 31 |
| 1.5 Klinikum, terápia  | 35 |
| 2. CÉLKITŰZÉSEK  | 36 |
| 2.1 Monocita Mac-1 aktivitásának jellemzése aktiváció specifikus antitesttel | 36 |
| 2.2. A CD40 ligand és a Mac-1 kapcsolatának vizsgálata                       | 37 |
| 2.3 A Mac-1 integrin és ligandjai a monocita - trombocita kapcsolatokban     | 37 |
| 2.4 A Mac-1 integrin viselkedése II típusú diabéteszben                      | 38 |
| 3. MÓDSZEREK   | 39 |
| 3.1 Phage-display, antitest válogatás  | 39 |
| 3.2 Citometriás és adhézios kísérletek                                       | 41 |
| 3.2.1 Trombociták és monociták izolálása és aktiválása                       | 41 |
| 3.2.2 Sejtkultúra  | 41 |
| 3.2.3 Adhézios kísérletek  | 42 |
| 3.2.4 A CD40 ligand kötődésének vizsgálata áramlási citometriával            | 42 |
| 3.2.5 Trombocita-sejt aggregátumok analízise áramlási citometriával          | 43 |
| 3.3 Betegcsoport   | 43 |
| 3.3.1 Laboratóriumi vizsgálatok  | 44 |
| 3.3.2 IL-6 és CD40L koncentrációk  | 44 |
| 3.4 Statisztikai analízis  | 44 |

|  |    |
|--|----|
| 4. EREDMÉNYEK  | 45 |
| 4.1 Phage-display, aktivációs specifikus antitestek tesztelése                                   | 45 |
| 4.1.1 Az antitest működésének tesztelése monocitákon   | 45 |
| 4.1.2 A monocita Mac-1 receptor vizsgálata az aktivációs specifikus antitesttel                  | 48 |
| 4.2 A CD40L a Mac-1 integrin ligandja  | 51 |
| 4.3 a Mac-1 szerepe a heteroaggregátumok kialakításában, GpIIb/IIIa és híd molekulák jelentősége | 56 |
| 4.4 a Mac-1 viselkedése II típusú diabéteszes betegekben   | 60 |
| 5. MEGBESZÉLÉS   | 63 |
| 6. KÖVETKEZTETÉSEK   | 69 |
| 7. ÖSSZEFOGLALÁS   | 71 |
| 8. SUMMARY   | 73 |
| 9. IRODALOMJEGYZÉK   | 74 |
| 10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE   | 93 |
| 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS  | 94 |

## Rövidítések jegyzéke

|   |  |
|---|--|
| ADP: adenzin-difoszfát  | LFA-1 limfocita funkció asszociált antigén, CD11a/CD18 adhéziós integrin                                     |
| AGE: fehérje-glikációs végtermék  |  |
| CHO: kínai hörcsög ovárium sejtvonal  | Mac-1: Makrofág-1 antigén, CD11b/CD18 adhéziós integrin, $\alpha_M\beta_2$ integrin, C3b komplement receptor |
| CHO wt: a Mac-1 integrint konstitutívan aktiválatlan formában prezentáló CHO sejtvonal                    |  |
| CHO del: a Mac-1 integrint konstitutívan aktivált formában prezentáló CHO sejtvonal                       | MCP-1: monocita kemoattraktáns protein-1   |
| CRP: C-reaktív protein  | MCSF: makrofág kolóniastimuláló faktor   |
| DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium táptalaj   | MFI: átlagos fluoreszcencia intenzitás   |
| ELAM: endotheliális leukocita adhéziós molekula   | MIF: makrofág migrációt gátló faktor   |
| eNOS: endotheliális nitrogén-monoxid szintetáz  | MIP-1 $\alpha$ : makrofág gyulladásos protein 1 $\alpha$   |
| FCS: foetalis borjú szérum  | MMP: mátrix metalloproteináz   |
| GpIIb/IIIa: glikoprotein IIb/IIIa, $\alpha_{2b}\beta_3$ trombocita adhéziós integrin, fibrinogén receptor | NO: nitrogén-monoxid   |
| GpIb $\alpha$ : glikoprotein Ib $\alpha$ , CD42, vWF receptor   | NOS: nitrogén-monoxid szintetáz  |
| HDL: nagy denzitású lipoprotein   | ROS: reaktív oxigéngyökök  |
| ICAM: intercelluláris adhéziós molekula   | PAF: trombocita aktiváló faktor  |
| IL: interleukin   | PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor-1   |
| JAM: junkcionális adhéziós molekula   | PAR1: proteáz aktivált receptor 1  |
| LDL: alacsony denzitású lipoprotein   | PBS: foszfát-puffer oldat  |
| oxLDL: oxidatíván módosult LDL  | PDGF: trombocita növekedési faktor   |
|   | PECAM-1: trombocita-endothel adhéziós molekula-1   |
|   | PF-4: trombocita faktor 4  |
|   | PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate   |
|   | PRP: trombocitadús plazma  |

PSGL-1: P-selectin glikoprotein  
ligand-1

RANTES: CCL5, regulated and  
normal T cell expressed and  
secreted

rhsCD40L: rekombináns humán  
szolubilis CD40 ligand

sCD40L: szolubilis CD40 ligand

sCD40LT: a sCD40L trimer formája

SR-A: scavenger receptor A

TF: szöveti faktor

TNF- $\alpha$ : tumor nekrózis faktor- $\alpha$

TGF- $\beta$ : tumor növekedési faktor- $\beta$

t-PA: szöveti plazminogén-aktivátor

TxA2: tromboxán A2

VCAM: vaszkuláris adhézíós molekula

vWF: von Willebrand Faktor

# 1. Bevezetés

## 1.1 Az érrelmeszesedés pathogenezeise

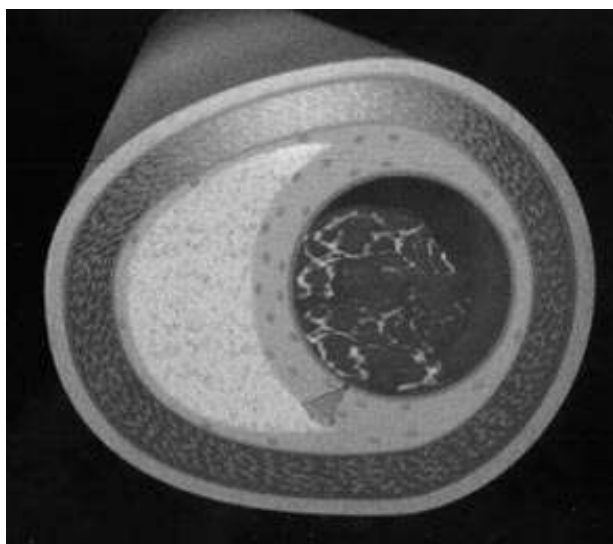
Az érrelmeszesedés diffúz elváltozás az erekben, mely már gyermekkorban elkezdődhet, és a rizikófaktorok fennállása esetén folyamatosan progrediál. Előrehaladott formában a vezető halálokokat jelentő miokardiális infarktus és stroke kialakulásában van alapvető szerepe. Az atherosclerosis legfontosabb rizikótényezői a magas vérnyomás, a szénhidrátháztartás felborulása, a kóros vérzsír- illetve lipoprotein szintek, az abdominális elhízás, az előrehaladott kor és a dohányzás [1,2]. A legújabb kutatási eredmények szerint érrelmeszesedésben a keringésben és az atherosclerotikus elváltozás területén is gyulladásos sejtek és mediátorok vannak jelen, és megnövekszik a keringő trombociták és leukociták aktivitása [3-13].

Morfológiai szempontból az érrelmeszesedés legkorábban jelentkező elváltozása a zsíros csík („fatty streak”), vagyis a zsírlerakódás az intimában. A lerakódó koleszterin-észterek zömmel a szubendotheliális tér sejtjeiben, intracellulárisan, részben extracellulárisan helyezkednek el. A lipidlerakódások gyakran a mechanikus hatásoknak jobban kitett érszakaszokon jelentkeznek [1,2]. Ebben a stádiumban, anyagcsere illetve áramlási viszonyok változásainak következtében, fokozódik az adhézis receptorok és kemokinek expressziója, ennek következtében a sejttes elemek (monociták, majd T limfociták) érfalba vándorlása [1,14-17]. Egyes eredmények szerint ebben a korai szakaszban, különösen a nagy nyíróerőknek kitett területeken már megfigyelhető a trombocita-endothel kölcsönhatások gyakoriságának változása [18-20].

A plakk-képződés stádiumában a lipidlerakódások körül intenzív myointimális sejtburjánzás indul meg, nagy lipidtartalmú habos sejtek jelennek meg, melyek a keringő, érfalba vándorló monocitákból, vagy az érfal simaizomsejtjeiből alakulnak ki. A burjánzó sejtek kollagént és kötőszöveti mukopoliszacharidokat termelnek, a lipidlerakódás körül így egy rostos kötőszövetes burok alakul ki, mely bedomborodik az ér lumenébe [1,2]. Ebben a szakaszban jellemző az endothelen jelen levő nagyszámú *adhéziós receptor* (VCAM, ICAM, E-selectin, P-selectin) és a sejtekből felszabaduló

*citokinek, kemoattraktánsok* emelkedett mennyisége (TF, MCP-1, MCSF, IL-1, IL-8, MMP-1), fokozódik a makrofágok lipidfelvételét elősegítő scavenger receptorok (SR-A, CD36) expressziója [1,14,15,17].

Ezt követően a plakk kötőszövetes rostjain  $\text{Ca}^{2+}$  lerakódás (calcinosis) indul meg, az érintett érszakasz keménnyé, merevvé válik, rugalmassága csökken. A plakk felszínén az endothel folytonossága megszűnik, a rostos burok felszakad, helyén prokoaguláns molekulák válnak szabaddá, kialakul a vulnerabilis plakk, ami a trombociták akkumulációjához és a leukociták kemotaxisához vezet [1,2].



1.1.1 ábra: Atherotrombózis, forrás: [www.images.md](http://www.images.md)

Az érlemezés kialakulásában számos tényező játszik szerepet; fizikai eltérések, mint az áramlási és vérviszkozitási jellemzők megváltozása, anyagcsere változások, endothel diszfunkció, gyulladásos illetve autoimmun folyamatok, keringő sejtes elemek érfalba vándorlása, működésének változása illetve lipoprotein retenció. Először azokat a tényezőket tekintjük át, amelyek jelenlegi ismereteink szerint hatással vannak a keringő sejtes elemek aktiválódására, aggregációjára illetve az érfalhoz történő kitapadására. Ezt követően kitérünk a keringő leukociták, trombociták és azok kapcsolódásában részt vevő molekulák jelentőségére, különös tekintettel a leukocita-trombocita kapcsolatok érlemezésben betöltött szerepére.

### ***1.1.1 Fizikai eltérések***

A vérben keringő sejtek aktiváltsága, egymással és az érfallal való kapcsolata nagymértékben függ a vér áramlásának fizikai jellemzőitől. Nagy nyíróerők fellépése esetén a keringő trombociták és az endothel aktiválódnak, ami fokozza a leukociták kitapadását és az érfal átépülését, illetve a leukocita-trombocita komplexek kialakulását [21-24]. Az áramlás függ az érfal átmérőjétől, a perfúziós nyomástól és a vérvizkozitástól (Poiseuille-törvény:  $Q = \Delta P \times \pi \times r^4 / l \times \eta$ , ahol  $Q$  az áramlás,  $\Delta P$  a perfúziós nyomás,  $r$  az ér sugara,  $l$  az érszakasz hossza és  $\eta$  a vérvizkozitás). Fiziológias körülmények között az érfal átmérőjének változtatásával reagál az áramlás változásaira: a nyírófeszültség növekedésére az endothel vazodilatációt kiváltó mediátorokkal válaszol (áramlásfüggő vazodilatáció). Krónikus hatásokra az érfal alakja és összetétele megváltozik (vaszkuláris remodelling), ezért nem lesz képes alkalmazkodni az áramlás változásaihoz. Az érfal megvastagszik, a lumen beszűkül, ami a nyíróerő fokozódásához, örvénylésekhez és az érfal mentén stagnációs pontok kialakulásához vezet. Mindez elősegíti a sejtek aggregációját és érfalhoz tapadását. Ezek a változások jól megfigyelhetők pl. az erek elágazódásánál, és a beszűkült érszakaszok mellett [1,2,21,25-27].

A vér viszkozitása fontos tényező a véráramlás sebessége szempontjából; a viszkozitás emelkedésével lassul a véráramlás, ami megnöveli a keringő sejtek és az endothel közti interakció idejét, elősegítve a vérlemezkék és leukociták kiapadását, illetve a véralvadási kaszkád beindulását. A vér viszkozitását meghatározza a benne oldott részecskék mennyisége és egymással való interakciója. A sejtes elemek száma (hematokrit) az egyik fontos tényező. Nagyerekben a vörösvértestek a véráram közepén, a leukociták és trombociták az érfalhoz közelebb helyezkednek el, ami a sejtek kölcsönhatásait, összecsapódását és ezáltal az áramlási jellemzőket is meghatározza. A vérvizkozitás másik fontos meghatározója a plazma viszkozitása, amit a víz és a benne oldott nagy molekulájú anyagok határoznak meg. Ezek közül a nagy, elongált szerkezetű fibrinogén a legfontosabb résztvevő, ami a vér trombogénitásának fontos meghatározója. Bizonyos betegségekben, pl. diabéteszben, hipertóniában,

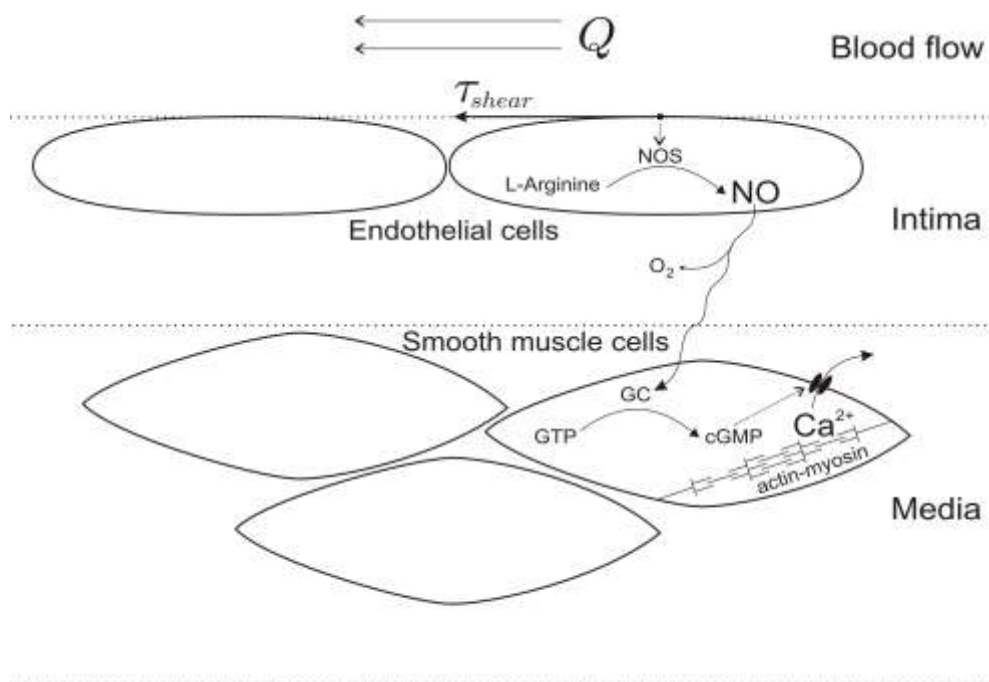


koronáriabetegekben, obesitasban, dohányosokban, illetve különböző gyulladásos kórképekben akut fázis fehérjeként megemelkedik a koncentrációja. Kóros állapotokban nem csak a fibrinogén, hanem más alkotóelemek, pl. globulinok, lipidek jelentősége is megnő [1,21].

### ***1.1.2 Endotheldiszfunkció***

Az *endothel* egyik legfontosabb szerepe az érfal integritásának megőrzése, a trombotikus-antitrombotikus, illetve az inflammatorikus-antiinflammatorikus folyamatok egyensúlyban tartása. Nagy kardiovaszkuláris kockázatú betegek esetében az áramlásban és vérviszkozításban bekövetkező fizikai változások, illetve a gyulladásos és trombotikus folyamatok tartós fennállása végül az endothel védekező mechanizmusait kimerítik. Károsodik az endothelsejtek integritása, felgyorsul a sejtek előregedése, fokozódik a sejtfelszíni adhéziós molekulák expressziója és csökken a nitrogén-monoxid termelése [1,16,21,28-30].

*Nitrogén-monoxid (NO)*: Az értónust szabályozó nitrogén-monoxid nagy része az endothelből szabadul fel, a nitrogén-monoxid szintetáz (NOS) enzim hatására, melynek egyik legfontosabb induktora a nyíróerők fokozódása. Hatására megemelkedik a cGMP intracelluláris koncentrációja, ami az érfal simaizomsejtjeinek relaxációjához vezet (1.1.2 ábra).



1.1.2 ábra: NO-mediált vazodilatáció (forrás: Wikipedia). A nyíróerők fokozódása a NOS aktivációjához, és fokozott NO termeléshez vezet. Az emelkedett NO szintre a simaizmok  $\text{Ca}^{2+}$ -dependens vazodilatációval válaszolnak.

A NO azonban nem csak a vazodilatációban játszik alapvető szerepet. Gátolja a leukociták aktivációját és migrációját, illetve a simaizomsejtek proliferációját [1,16,29,30]. Az endothelből illetve részben magából a vérlemezkéből származó nitrogén-monoxid gátolja a vérlemezkék P-selectin expresszióját, ezen keresztül azok adhézióját, aggregációját, az endothelhez való kapcsolódását és a leukocita-trombocita aggregátumok kialakulását [29,31-35], ezek a hatások pedig összességében gátolják a gyulladásos és trombotikus folyamatokat.

Nyugalmi állapotban az endothel nitrogén-oxid szintetáz (eNOS) enzime fontos szerepet játszik az endothel nyugalmi állapotának fenntartásában. A legtöbb kardiovaszkuláris rizikófaktor jelenléte azonban endotheliális aktivációt idéz elő, melynek során az eNOS működése megváltozik, ennek hatására a sejten belül a reaktív oxigéngyökök (ROS) szaporodnak fel [1,16,28-30].

### *Endotheliális áramlási stressz*

Az endothel felszínén jelen levő mechanoreceptorok érzékenyen válaszolnak az endotheliális áramlási stresszre. A sejt mitogén aktivált protein-kináz rendszerének aktiválásán keresztül megváltoztatják a sejt citoskeletáris struktúráját és aktiválják a NO szintézisét, segítve ezzel az érfal adaptációját. A folyamatos, kisfokú áramlási stressz azonban számos ponton módosítja az endothelsejt működését, ami végső soron az érlelmeszesedés progressziója irányába hat. Így például génexpresszió és fehérjeszintézis szintjén is gátolja a NO keletkezését, fokozza azonban a reaktív oxigéngyökök termelődését, és csökken az intracelluláris szabadgyökfogók szintje, ilyen módon növeli az oxidatív stresszt. Csökkenti a vazodilatátor anyagok, pl. a prosztaciklin koncentrációját, fokozza az endothel apoptotikus és mitotikus aktivitását. Az endothelsejtből fokozódik a mitogének felszabadulása is, ennek hatására simaizomsejtek vándorolnak az intimába, ahol fenotípusuk megváltozik, szintetikus aktivitásuk fokozódik és proliferációra is hajlamosak lesznek. A simaizomsejtek által termelt kollagén és más extracelluláris fehérjék ugyanakkor fontosak a plakkot stabilizáló fibrotikus burok kialakításában. Ezzel ellentétes hatású a fibrotikus réteg lebontásában fontos mátrix metalloproteinázok (MMP) expressziójának fokozódása. Növekszik viszont az endothelsejtek LDL-termelő kapacitása, emellett megváltozik az endothelsejtek egymáshoz illeszkedése, ezért az LDL diffúziója is növekszik [1,16,25,30].

A kisfokú áramlási stressz emeli az endothelen az *adhézós molekulák* szintjét és indukálja az IL-8-at, ami elősegíti a monociták érfalba vándorlását [25-27]. A trombociták szintén érzékenyen reagálnak az áramlás változásaira, az endothellel való kölcsönhatásuk pedig elősegíti a leukociták érfalhoz tapadását [18,19,36].

### **1.1.3. Hipertónia**

Hipertónia betegségben a keringő sejtes elemek és kitapadásuk szempontjából elsődleges a megváltozott hemodinamikai környezet. A szív és az erek szerkezete a mechanikai terhelés hatására megváltozik: a média a simaizomsejtek hipertrófiája és hiperpláziája miatt megvastagszik, nő a kollagén mennyisége, csökken az erek compliance-e.

A megnövekedett nyíróerők miatt fokozódik a trombociták aktivitása. Az endothelium is igen érzékenyen válaszol a tartósan kedvezőtlen mechanikai hatásokra: *endotheldiszfunkció* alakul ki, vazóaktív anyagok egész sora szabadul fel, a vazodilatatív (nitrogén-monoxid, prosztaciklin, hiperpolarizáló faktor) és vazokonstriktív (endothelin-1, tromboxan A<sub>2</sub>, prostaglandin H<sub>2</sub>, angiotenzin II, szerotonin) anyagok egyensúlya megbomlik. A vazokonstriktív anyagok egy része emellett elősegíti a *trombocitaaggregációt* is. Ehhez társulnak más jelen levő, atherotrombotikus folyamatokat elősegítő mediátorok, pl. gyulladásos faktorok, TNF- $\alpha$ , PAI-I [1,37].

A vérnyomás, különösen a szisztolés érték pozitív korrelációt mutat a trombociták aktivitásával és a monocita-trombocita aggregátumok keletkezésével. Ez utóbbi háttérében valószínűleg a P-selectin expressziójának vérnyomásfüggő emelkedése áll, aminek mechanizmusa azonban jelenleg nem teljesen ismert [31,38]. Hipertóniásokban a vérlemezkék nitrogén-monoxid termelése is károsodott, kevésbé képes reagálni a stimulációra. Ugyanakkor megemelkedik a keringő NOS gátlók koncentrációja, csökken az endothel válaszkészsége és a trombociták exogén NO-ra adott reakciója is. Mindezek következtében a trombociták aktivitása fokozódik és megemelkedik a keringő monocita-trombocita aggregátumok mennyisége [31].

#### ***1.1.4 Anyagcsere eltérések***

Bizonyos anyagcsere változások fokozzák az érlelmeszesedés progresszióját. Ilyen pl. a diabétesz, a lipideltérések, a metabolikus X szindróma. Ezen a helyen azokra az anyagcsere eltérésekre térünk ki, amelyek igazoltan hatással vannak a keringő sejtek működésére és a sejtek aggregációjára.

#### ***Lipidanyagcsere eltérések***

*LDL-koleszterin:* A hiperkoleszterinaemia, különösen az LDL koleszterin szintjének megemelkedése számos folyamatot indít el, ami az érlelmeszesedés kialakulásához illetve progressziójához vezet. A hiperkoleszterinaemiára adott egyik első válasz az adhézións molekulák és receptoraik fokozott megjelenése az endothel és a leukociták felszínén, illetve a kemoattraktáns faktorok koncentrációjának

megemelkedése. Egészséges egyedekben azonban a sejtek védettek a koleszterinterheléssel szemben. Az LDL különböző módokon módosulhat, pl. oxidáció (ox-LDL), acetilálódás (acetyl-LDL), immunglobulin-komplexekhez való kötődés, ezek a módosult formák már gyorsan bejutnak a makrofágokba a scavenger A receptoron keresztül. Az oxLDL emellett több atherogén tulajdonsággal is rendelkezik: citotoxikus hatással van az endothelsejtekre, mitogén hatást fejt ki a makrofágokon és simaizomsejteken. Endothelsejteken fokozza az IL-1, IL-8, MCP-1, MCSF, VCAM expresszióját és a kollagénszintézist, ugyanakkor gátolja a NO felszabadulását. Növeli a simaizomsejtek kollagéntermelését, fokozza a Fas-mediált apoptózist, aktiválja a NF $\kappa$ B-t, fokozza a MMP-1 expresszióját és növeli az intracelluláris kalciumszintet. A keringő leukocitákon kemotaktikus hatású, fokozza az endothel és a monociták felszínén az adhéziós molekulák szintjét [39-41], és elősegíti a monociták, neutrofilek és limfociták endothelhez történő adhézióját [41-43].

*HDL-koleszterin:* A HDL-koleszterin szintje és a koronáriabetegség prevalenciája között fordított arányosság áll fenn, mely a HDL reverz koleszterintranszportban betöltött szerepével magyarázható. A HDL-nek azonban vannak egyéb antiatherogén tulajdonságai is. Jelenlegi ismereteink szerint a HDL csökkenti az endothelen az adhéziós molekulák (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin) kifejeződését, ennek következtében a monociták kitapadását is. Gátolja az oxLDL keletkezését a májban termelődő paraoxonáz enzimmel való kölcsönhatása révén, illetve gátolja az oxLDL által okozott apoptózist és NO szintézis-csökkenést is. Szövődmenyes esetekben megbomlik a plakk felszínén az endothelréteg, ami trombociták és leukociták kitapadásához vezet. Ebben a stádiumban a HDL fokozza az endothelsejtek proliferációját. Endothelen csökkenti a növekedési faktorok (EGF, FGF) felszabadulását és fokozza a prosztaciklin, az endothelin-1 és a natriuretikus peptid C termelését, ami a simaizomsejtek proliferációjának gátlásához, illetve vazodilatációhoz vezet. Az endotheliális barrier károsodása után fokozza a simaizomsejt-proliferációt, ami gátolja a plakk fibrózus sapkájában történő sejtsökkenést, ami szintén a plakk stabilitását segíti elő, emellett fokozza a koleszterin kiáramlását a makrofágokból és habos sejtekből. A HDL csökkenti a trombociták aktivitását (fokozza a NOS és a PKC aktivitását, ezért csökken az intracelluláris raktárakból a Ca<sup>2+</sup> kiáramlás, végső soron az aktivitás), és a

véralvadást, a X-es véralvadási faktor aktiválódásának gátlásán keresztül. A HDL a fibrinolízisre is hatással van; szintje negatívan korrelál a PAI-1 és tPA szinttel [1,16].

*Trigliceridek:* A trigliceridben dús lipoproteinek szintje összefüggést mutat az érrelmeszesedés kialakulásával és progressziójával, sőt, a remnant lipoproteinek szintje a koronáriabetegség független rizikófaktorának bizonyult [44]. A kilomikronok és a VLDL-remnant partikulumok képesek belépni az artériák falába, ahol a simaizomsejtek és a makrofágok felveszik őket. A lipoprotein lipáz (LPL), mely normális esetben segíti a trigliceridben gazdag lipoproteinek lebomlását a zsírszövetben, az artéria falában proatherogén tulajdonságú lehet. A makrofágok által termelt LPL ugyanis fokozza a trigliceridben gazdag lipoproteinek penetrációját és retencióját az érfalban és növeli endocitózisukat a makrofágokba. A remnant lipoproteinek az érfalban növelik a simaizom-proliferációt, az endothel ICAM-1, VCAM-1 és TF expresszióját. Serkentik a keringő monociták adhézións receptorainak expresszióját és azok endothelhez való kitapadását [44]. Emellett feltehetően a gyulladásos folyamatot is serkentik. Az emelkedett VLDL és kilomikronszint gyakran jár együtt csökkent HDL és a kicsi, sűrű LDL emelkedett szintjével, ami tovább fokozza az atherogén hatásokat. Az eddigi vizsgálatok alapján ebben az LPL-aktivitás csökkenésén túl az inzulinrezisztencia játssza a döntő szerepet [1,16].

*Lipoprotein(a):* A koronáriabetegség, a stroke és a vénás trombózis szempontjából a lipoprotein(a) szintje (30 mg/dl felett) független rizikótényezőnek bizonyult. Proatherogén hatásai az LDL-hez hasonló tulajdonságaival magyarázhatóak, míg protrombotikus hatásai a plazminogénhez hasonló szerkezetével. Hatására az intimában fibrinlerakódás, koleszterin felhalmozódás és simaizomsejt proliferáció alakul ki. Antifibrinolitikus hatású; fokozza a PAI-1 és gátolja a t-PA szintézisét. Gátolja a TGF- $\beta$  aktivációját, amivel fokozza az intimális simaizomsejtek migrációját és proliferációját [1]. Az oxidált lipoprotein(a) emellett fokozza a Mac-1 adhézións integrin expresszióját [45].

## ***Diabétesz***

A cukoranyagcsere változásai súlyos elváltozásokhoz vezetnek a nagyerekben. Ennek köszönhetően a diabéteszes betegek várható élettartama mintegy 10-15 évvel rövidebb, mint a nem diabéteszes populációé. A korai halálozást az esetek 75-80%-ában a diabétesz makrovaszkuláris szövődményei idézik elő (a stroke 3-szor, a koronária elzáródás 3-5-ször, az alsó végtagi amputáció 15-ször gyakoribb az átlagnál ebben a betegcsoportban) [1].

A vércukorszint emelkedése már jóval a diabétesz manifesztációja előtt változásokat idéz elő az érfalban. A korai stádiumban jelentkező inzulinrezisztencia és emelkedett inzulinszint atherogén hatással bír: elősegíti a simaizomsejtek proliferációját és migrációját, fokozza a nátrium visszaszívást a tubulusokban és erősíti a szimpatikus tónust, így emeli a vérnyomást, ráadásul károsodást szenved a nitrogén-monoxid mediált vazodilatáció is [1,37,46]. Az inzulin a lipidanyagcserében is proatherogén változásokat idéz elő: emeli a szabad zsírsavak és a trigliceridben gazdag lipoproteinek szintjét [1].

A tartósan emelkedett vércukorszint következtében a glükóz kapcsolódik a fehérjék aminos csoportjához, AGE (advanced glycosilated endproducts) képződését idézi elő. A fehérjék glikációja a szerkezeti fehérjék denaturációjához, káros keresztkötések és receptor-AGE komplexek (RAGE) kialakulásához vezet, ami többek között a kiserek és glomerulusok bazális membránjának elváltozásaiért, és végső soron a mikroangiopátiáért, diabéteszes nefropátiáért, és retinopátiáért felelős. A glikozilált fehérjék kötődnek az endothel, a simaizom és a monociták AGE-receptoraihoz, melyeknek a száma diabéteszben megemelkedik. A kötődés a sejtekben atherogén változásokat idéz elő; fokozódik például a szabadgyökök képződése, a növekedési faktorok termelése és a citokinek aktiválódása. Az AGE másik hatása, hogy aktiválja a protein-kináz C-t és a mitogén-aktivált protein kinázt. A kapcsolódó jelátviteli folyamatok hatással vannak az érfal permeabilitására és a növekedési faktorok képződésére [1,47].

Diabéteszben megnő a trombociták mérete és aktivitása, hajlamosabbak lesznek az aggregációra és adhézióra [48]. Intenzívebben reagálnak aktivátoraikra, ennek során

fokozódik a kalcium mobilizálódása az intracelluláris raktárakból és a mediátorok felszabadulása az  $\alpha$ -granulumokból. Csökken a NO szintézise és az általa kiváltott reakciók mértéke. Fokozódik a COX működése és a reaktív oxigéngyökök termelése, valamint a PAI-1 felszabadulása. A glikozilált fehérjéknek köszönhetően megváltoznak a sejtmembrán tulajdonságai. Nő az adhéziós receptorok, a GpIIb/IIIa expressziója és aktivitása [46]. A vércukorszint akut emelkedését összefüggésbe hozzák a trombocita aktivitását érzékenyen jelző leukocita-trombocita aggregátumok emelkedett szintjével [49,50].

A cukorbetegség hatására létrejövő kóros működés súlyosbítja az érlemezés progresszióját és a plakkruptúra következményeit. Az anyagcsere kedvező változása azonban már három hónap elteltével kimutathatóan csökkenti a trombociták aktivációját [46]. A trombocitagátló kezelések szintén fontos összetevőjét képezik a primer, szekunder és terciér vaszkuláris prevenciónak diabéteszben és metabolikus szindrómában [1,2,46].

A diabétesz hatásainak vizsgálatát nehezíti, hogy egyes eredmények szerint az inzulinkezelés hatással van a keringő trombocitákra és leukocitákra. Bár az adatok nem egyértelműek, az inzulin fokozhatja a trombociták tromboziskészségét és P-selectin expresszióját, illetve a leukociták CD11b expresszióját. Inzulinkezelés hatására növekszik a trombocita-leukocita komplexek száma is [51,52]. Ugyanezt a hatást egészséges egyének hiperinzulinaemiája kapcsán is leírták [50].

## ***Obesitas***

A túlsúly és a kardiovaszkuláris kockázat összefüggése mára egyértelművé vált [1,2,53]. A zsírszövet bonyolult metabolikus és endokrin funkciót ellátó szerv, ezért megnövekedett mennyisége nem csak fizikailag terheli meg a szervezetet, hanem számos anyagcsereváltozással jár együtt. A megnövekedett postprandialis szabad zsírsav koncentráció például összefüggésben van a fokozott lipolízissel, az inzulinrezisztenciával és a dyslipidaemiával. A szabad zsírsavak emellett direkt atherogén hatást fejtenek ki az endothel mediált vazodilatáció gátlásán keresztül. Az obesitas emellett fokozza a magas vérnyomás, diabétesz és dyslipidaemia kockázatát is [53,54].



Az elhízás és a kardiovaszkuláris kockázat kapcsolatában számos tényező szerepelhet. Sokat vizsgáltak például az obesitas és az inzulinrezisztencia kapcsolatát. Mivel a zsírszövet endokrin funkciókat is betölt, jelentősége lehet az általa termelt mediátoroknak. Az *I-es típusú 11-béta-hidroxiszteroid dehidrogenáz* a kortizolanyagcserébe való beavatkozással elősegítheti az inzulinrezisztenciát. A *leptin* az étvágy és az energiafelhasználás szabályozásán felül az izom és a zsírszövet zsíryanycseréjének szabályozásával irányítja a zsírmegoszlást és gátolja a májban a trigliceridek akkumulációját. Inzulinrezisztenciában magasabb a leptin szintje, ami egyik oka lehet az endothel diszfunkciónak és a restenosis kialakulásának. Az *adiponektin* negatívan korrelál az inzulinrezisztenciával és az elhízással, csökkenti az érermeszesedést, a diabétesz kialakulását, a vaszkuláris remodellinget és a hepatikus glükózkíáramlást. A *rezisztin* szintje korrelál az elhízás és az inzulinrezisztencia mértékével és fokozza a máj glükóztermelését. Elősegíti az érermeszesedés progresszióját, mivel simaizomproliferációt idéz elő és csökkenti az endothelfunkciót. Gyulladásos faktorok, mint az LPS és a TNF- $\alpha$  emelik a szintjét [1,2,53].

Obesitasban bizonyos változások azonban közvetlen hatással is lehetnek a keringő sejtes elemekre illetve az atherosclerosis kialakulására és progressziójára. A *plazminogén aktivátor inhibitor-1* (PAI-1) nagyobb mértékben termelődik a viszcerális zsírban, mint a szubkutánban, és emelkedett koncentrációja csökkent inzulinérzékenységgel jár együtt [1]. Fokozza a trombociták aktivitását, ezzel direkt módon növeli az atherotrombózis kockázatát [46]. Abdominális elhízásban magasabb a keringő CRP szintje, ami krónikus, alacsony intenzitású gyulladásra utal. A CRP direkt módon rontja az endothelfunkciót: elősegíti az endothelin és az endotheliális adhéziós molekulák (VCAM-1, ICAM-1) expresszióját, ami a leukociták fokozott kitapadásához vezet. A CRP gátolja a NO szintézist, a csökkent NO szint pedig fokozott trombocita aktivációval jár [1,37,55].

A zsírszövetben, illetve gyulladás esetén a zsírszövetet infiltráló makrofágokban fokozott mennyiségben termelődnek bizonyos citokinek és kemokinek: mint a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 receptor antagonist, MCP-1 (monocita kemoattraktáns protein), MIF (makrofág migrációt gátló faktor), makrofág eredetű gyulladásos protein

1-alfa és gyulladásos proteinszerű fehérje-2, és bizonyos akutfázis fehérjék (amiloid-A3, haptoglobin). A TNF- $\alpha$  proatherogén, illetve prodiabetogén hatású, és az adipocitákban parakrin funkciót lát el. Csökkenti a lipoprotein lipáz aktivitását, gátolja a PPAR- $\gamma$ -t és növeli az adipociták lipolízisét. Az IL-6 proatherogén, prodiabetogén és elősegíti a vaszkuláris gyulladást, növeli a májban a CRP termelést [1,37,55].

### ***1.1.5. Dohányzás***

A dohányzás érrendszerre gyakorolt káros hatásainak több összetevője van. A hatások hátterében egyrészt a nikotin, másrészt a dohányfüsttel a szervezetbe jutó égéstermékek, illetve maga a dohányzás, mint viselkedésforma állnak.

A nikotin hatása összetett: idegi, vaszkuláris és sejtszinten is elősegíti az érfalkárosodás irányába ható folyamatokat. Idegi hatásaihoz tartoznak pl. az agytörzsre kifejtett hatás, a perifériás- és a karotisz kemoreceptorainak aktiválása, a perifériás erekben található idegvégződések működésének befolyásolása és a mellékveséből felszabaduló katekolaminok szintjének fokozása. A nikotin szív- és érrendszeri hatásai közül a legfontosabbak a szívfrekvencia és a perctérfogat emelése, a szívizomzat kontraktilitásának fokozása. A bőrerekben vasokonstriktiót, az izomzatban vazodilatációt okoz, amihez a dohányzás kapcsán felszabaduló adrenalin is hozzájárul. A katekolamin-felszabadulás fokozza a koronáriaerek ellenállását, ami alfa-adrenerg blokkolókkal gátolható. A dohányzás emellett gyorsítja az atrioventricularis csomóban az ingerületvezetés sebességét, amivel növeli a ritmuszavarok kockázatát. A dohányzással a szervezetbe kerülő szén-monoxid csökkenti a vér oxigénszállító kapacitását, emiatt a vörösvértesttömeg nagyobb lesz. Emelkedik a vér fibrinogénszintje, ami az előbbi változással együtt a vér viszkozitásának fokozódását eredményezi. Eltolódik a vazodilatátor és vazokonstriktor mediátorok egyensúlya, csökken a nitrogén monoxid szintézise. Dohányzás hatására megnő a reaktív oxigéngyökök mennyisége és csökken a szervezet antioxidáns így pl. a C-vitamin szintje, ami azok káros hatásait kivédhetné [1,56,57].

A dohányzásnak illetve a dohányfüstnek a keringő sejtekre gyakorolt hatása az eddigi eredmények alapján nagy valószínűséggel a reaktív oxigéngyököknek

köszönhető. Állatkísérletes vizsgálatokban például a dohányfüst elősegítette a leukociták endothelhez való kitapadását, ami szuperoxid-dizmutázzal illetve C-vitaminnal kivédhető volt, E-vitaminnal azonban nem, ami a vízdoldékony reaktív oxigéngyökök jelentőségére utal [56].

Dohányfüst-koncentrátum hatására *in vitro* az endothelen fokozódik az adhéziónak molekulák (ICAM-1, ELAM-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule)), a monocitákon pedig a CD11b expressziója [58]. A monocita CD11b felszíni expressziója a dohányfüst-koncentrátum töménységétől függ és reverzibilis, egy idő után (*in vitro* adatok szerint 35 perc után) újra csökkenni kezd. Ezzel összhangban, dohányosokban nem találtak emelkedett CD11b szintet, stimuláció hatására azonban a nemdohányzókhoz képest nagyobb expressziónövekedés volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy dohányosokban a monociták adhéziónak készsége megemelkedik. A fokozott adhezivitást a szerzők a dohányzás kapcsán a szervezetbe jutó szabadgyököknek tulajdonítják, mivel a fokozott adhéziónak C-vitamin szupplementációval kivédhető volt [56]. A dohányzás növeli a trombociták aktivitását, és felszíni P-selectin expresszióját is, amelyben a vizsgálatok szerint egy a dohányosokban megemelkedett növekedési faktornak, a thrombopoietinnek is szerepe van [59]. Dohányosokban szignifikánsan emelkedett leukocita-trombocita aggregátumok szintet találtak [59-61], melynek hátterében valószínűleg a megnövekedett P-selectin és CD11b szintek állnak [56,59]. A dohányzás mértékétől függően megemelkedik a trombociták CD40 ligand és a monociták CD40 expressziója is [61].

### ***1.1.6 Életmód, diéta***

Az életmód és a táplálkozás érelmeszesedéssel való kapcsolatának óriási irodalma van. Az érelmeszesedés megelőzéséhez, illetve progressziójának lassításához éppen ezért hozzátartozik a fizikai aktivitás és a helyes diéta megválasztása [62]. Ennek legfontosabb elemei a telítetlen illetve többszörösen telítetlen zsírsavak fogyasztása a telített és transz-zsírsavak helyett, az omega-3 zsírsavak fokozott bevitele, a rostokban, vitaminokban, vagyis a zöldségekben, gyümölcsökben és teljes kiőrlésű gabonában gazdag élelmiszerek előnyben részesítése. Ezek jótékony hatásai magukban foglalják a szérum triglicerid, az LDL- és összkoleszterinszintek csökkenését, a HDL

koleszterinszint emelését, a trombogenitás csökkenését, az endothel diszfunkció javulását. Ezek közül a tényezők közül most azokat tekintjük át részletesebben, amelyek jelenlegi ismereteink szerint az érlelmeszesedés szempontjából kulcsfontosságú sejtek működésére hatással vannak, különös tekintettel a keringő sejtekre.

*Olívaolaj:* In vitro vizsgálatok alapján az olívaolaj gátolja a trombocita aktivációt és az aggregációt, csökkenti a sejtfelszíni P-selectin expresszióját. Hatással van a trombocita fehérjeszintézisére, ezen keresztül a trombocita szerkezetére, aggregációjára, és apoptózisára, emellett csökkenti a GpIIb/IIIa integrin (fibrinogén receptor) expresszióját [63,64].

*Omega-3 zsírsavak:* A többszörösen telítetlen zsírsavak többféle mechanizmuson keresztül befolyásolják a gyulladás folyamatát. Ezek egyike a sejtmembránok fluiditásának változtatása, melynek hatása kiterjed a jelátvitelre, a génexpresszióra és a sejtfelszíni molekulák megjelenésére is. A gyulladásban résztvevő sejtek membránja különösen gazdag n-3 (omega-3 zsírsavak; eicopentaenoic acid: EPA és docosahexaenoic acid: DHA) és n-6 (arachidonsav) zsírsavakban. A táplálékkal bevitt többszörösen telítetlen zsírsavak a sejtek membránjába épülve kimutathatóan hatással vannak azok működésére, a gyulladásban résztvevő sejtek sejtmembrán-szerkezetének változása többek között megváltoztatja a gyulladásos citokinek és a sejtfelszíni adhéziós molekulák megjelenését. A halolaj tipikusan gazdag többszörösen telítetlen omega-3 zsírsavakban. Ezek fogyasztása aszpirin és statinkezelés mellett is kimutathatóan gátolja a trombociták ADP hatására bekövetkező aktivációját, csökkenti a trombocita felszíni P-selectin és GpIIb/IIIa expresszióját, mindemellett kimutathatóan javítja a károsodott endothelfunkciót [64-67].

*C-vitamin:* A C-vitamin vízzoldékony antioxidáns, direkt módon csökkenti a reaktív oxigéngyökök által okozott elváltozásokat. Dohányosokban a C-vitamin szupplementáció visszafordítja a dohányzás káros hatásainak egy részét, így például felfüggeszti az endotheliális NOS gátlását és visszaállítja az adhéziós receptorok, pl. a CD11b expresszióját a normál tartományba [56].

*Zöldségek, gyümölcsök:* A zöldségek és gyümölcsök alacsony zsír- és kalóriatartalmuk, kedvező nátrium/káliumarányuk, illetve magas rost- és antioxidáns tartalmuk (főleg E- és C-vitamin) révén fontos szerepet töltenek be az egészséges táplálkozásban, fogyasztásuk kimutathatóan csökkenti a kardiovaszkuláris kockázatot. Hatásaik egy része flavonoid-tartalmukhoz köthető. A flavonoidok a polifenolok csoportjába tartozó molekulák, csökkentik az érlelmeszesedés progresszióját, amelynek részeként sejtszintű jótékony hatásait is kimutatták. Ennek megfelelően javítják az endothelfunkciót, az inzulinérzékenységet és csökkentik a vérnyomást és a trombocita aggregációt [68,69].

- *Kakaó:* A kakaóban található polifenoloknak antioxidáns, gyulladásgátló hatása van, NO metabolizmusra kifejtett hatásuk révén pedig javítják az áramlásfüggő NO választ és a vazodilatációt, javítják az endothelfunkciót és a koronária keringést, csökkentik a vérnyomást és a LDL koleszterin szintjét és javítják az inzulinérzékenységet. Néhány vizsgálat kimutatta, hogy a kakaónak trombocitagátló hatása is van, amely az ADP/kollagén-aktivált primer hemosztázis illetve az aktivált GpIIb/IIIa expressziójának gátlásán keresztül valósul meg. Ezt a hatást *in vitro* vizsgálatokban is megerősítették. A kakaó nem csak a trombociták aggregációját, hanem adhézióját is csökkentette [70].

- *Szőlő és vörösbort:* A szőlőnek és a vörösbortnak antiatherogén hatásokat tulajdonítanak. Ilyen a sejtek redox állapotának kedvező alakulása és az LDL oxidáció gátlása, illetve az endothelfunkció javulása a NO termelés serkentése és a génexpresszió kedvező módosítása révén, melyre jó példa a Sirtuin-1 nevű fehérje szabályozása. A Sirtuin-1 a sejt túléléséért felelős gének expresszióját befolyásolja és csökkenti a p53 expresszióját. A szőlő és vörösbort kedvező hatásai közé tartozik továbbá a vérnyomás csökkentése és a gyulladásos folyamatok gátlása. A vörösbort fogyasztása gátolja a nagy zsírtartalmú ételek és a dohányzás következtében akutan kialakuló endotheliális diszfunkciót. Az említett hatások nagy része nem csak a vörösbort, hanem a szőlő fogyasztása esetén is kimutatható volt. A vörösbort emellett kimutathatóan csökkenti a monociták endothelhez történő kitapadását és gátolja az endotheliális adhéziós molekulák stimulációra bekövetkező expresszió-növekedését [68,69,71].

*In vitro* vizsgálatok alapján, a szőlőből származó polifenolok csökkentették a trombociták aktivitását, gátolták a ciklooxigenázt és a tromboxán A<sub>2</sub> szintézisét és a

hidrogén-peroxid keletkezését, illetve a foszfolipáz C és protein kináz C aktivációját. Csökkent a trombocitaaggregáció, amely fokozott NO produkcióval és csökkent szuperoxid-anion képződéssel járt együtt. Állatkísérletes modellben vörösbor per os alkalmazását követően (kutyákban és majmokban) mérhetően csökkent a trombociták működése, amely összefüggött a NO szintézisével [71]. Humán vizsgálatokban szintén kimutatható volt a szőlő jótékony hatása, eszerint szőlőlé fogyasztása gátolja a trombocitaaggregációt és a szuperoxid keletkezését, és emelkedett NO szintézissel jár. Gátolja ugyanakkor a protein kináz C-t és emeli a sejtekben az antioxidáns szintet. A vizsgálatok szerint a vörösbor hatékonyabb, mint a fehérbor. Más, antioxidánsokban gazdag gyümölcslevek esetében nem, illetve kevésbé voltak tapasztalhatóak az említett jótékony hatások [68,69,71].

*Fizikai aktivitás:* A rendszeres testmozgás javítja az immunrendszer működését, csökkenti az érlelmeszesedés kockázatát és a szövődeményeinek kialakulását. Csökken az LDL és VLDL, növekszik a HDL koleszterin szintje. Csökken a nyugalmi és a terheléses pulzus, csökken a terhelés hatására bekövetkező vérnyomásemelkedés, de növekszik a miokardium kontraktilitása. A fizikai aktivitás emellett javítja a glükóztoleranciát és az inzulinérzékenységet, növeli a fibrinolitikus aktivitást és gátolja a trombocita aggregációt [1]. Érdekes módon, edzetlen egyéneknél, az erőteljes fizikai aktivitás rövidtávon emeli a vérben keringő trombociták aktivitását, P-selectin expresszióját, a keringő mikropartikulumok és leukocita-trombocita aggregátumok mennyiségét [72]. Ezek a változások kifejezettebbek voltak erős, szubmaximális terhelés esetén. Kisebb mértékű terhelés esetén kisebb mértékű aktiváció volt megfigyelhető. Az említett folyamatok eredőjeként, rendszeres testmozgást végzőkben egyensúlyban van a hemosztázis [73].

### ***1.1.7 Leukociták***

Az érlelmeszesedés folyamatában nagy jelentősége van a véráramból az érfalba kilépő és az intersticiális szövetekben felszaporodó leukocitáknak. A sérült érfal endotheléből, más leukocitákból és az érfalhoz tapadó trombocitákból felszabaduló citokinek, kemokinek utasítást adnak a fehérvérsejtek számára az érfalhoz való

kapcsolódásra. Az érfalba való kilépés egymás után következő és egymásra épülő adhézív kölcsönhatások folyamata, melyben szelektinek és integrinek vesznek részt. Egy átmeneti, gyengébb kapcsolódást követően, melyet a szelektinek (P-, E- és L selectin) mediálnak, a fehérvérsejtek végiggurulnak az érfelszínen (rolling), majd ha a kemotaktikus inger és az aktiváció elég erős, integrinek közvetítésével egy stabilabb (firm) adhézió következik (főként  $\beta_2$  integrinek közvetítésével; a folyamatban a CD11a/CD18 (LFA-1) és a CD11b/CD18 (Mac-1) is szerepel). Az endothelen keresztül történő migrációban szintén a  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_7$  integrinek, valamint a PECAM-1 és sejtközzötti adhéziós molekulák (JAM-1, JAM-2, JAM-3, CD99) vesznek részt [1,15,74-76].

A leukocitákon található adhéziós molekulák és endotheliális partnereik jelenléte éppen ezért kulcsfontosságú az érlemezés folyamatában. Sejtfelszíni megjelenésüket számos tényező befolyásolja. Az adhéziós molekulák egy része konstitutívan megtalálható a plazmamembránon, (pl. L-selectin) míg mások aktiváció hatására kerülnek a felszínre. A stabil adhéziót létrehozó integrinekre jellemző, hogy aktivációt követően ligandkötésük sokszorosára nő. A sejtfelszíni molekulák expressziója és aktivitása különböző stimulusok hatására megváltozik. A korábban említett fizikai és kémiai eltérések (magas vérnyomás, megnövekedett nyíróerők, vércukorszint, vérzsírszintek változása, táplálkozási szokások), illetve bizonyos gyulladásos mediátorok (pl. IL-1, TNF- $\alpha$ ) növelik az adhéziós molekulák, pl. a VCAM, ICAM-1, P-selectin, CD11b sejtfelszíni megjelenését illetve aktivitását is [1,15,17,74-76].

A leukocita-trombocita aggregátumok kialakulása szintén a leukocitákon levő adhéziós molekulák fokozott expressziójához vezet. Emellett megváltozik a sejtek citokintermelése és a fagocitózisra való hajlam [77]. A változások hatására megnő a fehérvérsejtek érfalhoz tapadásra való hajlama és fokozódik a gyulladásos válaszkészség [36].

Az érfalba történő kivándorlásban részt vevő sejtadhéziós molekulák, receptorok és kemokinek bármelyikének gátlása potenciális terápiás célpontot jelent az atherosclerosis progressziójának csökkentésére. A P-selectin, E-selectin, CD18 integrin,

ICAM-1, VCAM-1 és CD44 gátlása bizonyítottan csökkenti az érlemezés folyamatát. A legmarkánsabb hatást ezek közül a P- és E-selectin egyidejű gátlásával lehetett elérni [78]. Hasonlóan nagy jelentőségű molekula a CD18 integrin, melynek kiiktatásakor a léziók progressziója 50%-kal csökkent a kontrollcsoportéhoz képest [79]. Ezzel szemben, jelenlegi ismereteink szerint a többi, a folyamatban részt vevő sejtadhéziós molekula gátlása nem volt ilyen mértékű hatással az érlemezés progressziójára [17].

### ***1.1.8 Trombociták***

A trombociták a megakariocitákból származó sejtöredékek, melyek hagyományosan a hemosztázisban és trombusképzésben játszanak alapvető szerepet. Aktiváció hatására szerkezeti átalakuláson mennek keresztül, diszkoid alakjuk hosszú pszeudopódiumokkal tarkított, csillagszerű formát vesz fel és egy sor szolubilis és membránkötött molekulát prezentálnak. Az aktivációt fizikai és kémiai mediátorok is előidézhetik, például a nagy nyíróerők, turbulencia, a trombin, a kollagén, az ADP, az adrenalin, a vazopresszin, a szerotonin, a PAF, és ezen kívül még számos szolubilis és felszínhez kötött molekula. Az aktivált vérlemezkék szerepet játszanak az érlemezés trombotikus folyamataiban, a felszínükön jelen levő, ill. granulumaikban tárolt molekulák pedig hozzájárulnak a trombociták más gyulladásos sejtekkel való kommunikációjához az érlemezés gyulladásos folyamataiban [20,46].

Aktivált trombociták egészen a korai elváltozásoktól kezdve megtalálhatóak az érlemezés különböző fázisaiban. Elsőként Fitzgerald és munkatársai írták le az aktivált trombociták jelenlétét instabil atherosclerotikus betegségben 1986-ban. Az aktivációt ebben a korai időszakban a P-selectin trombocita felszíni megjelenésével határozták meg [20]. A vérlemezkék aktivációját azóta az érlemezés több rizikófaktorával összefüggésben leírták: így pl. emelkedett koleszterinszint esetén [80], magas vérnyomásos betegekben [81], diabéteszben [82], dohányzóknál [83]. Nagy kiterjedésű trombotikus eseményeket megelőzően (pl. MI vagy stroke) szintén a megemelkedett aktivált trombocitaszám jelzi az érlemezés progresszióját.



Trombotikus események során az aktiváció a trombocita adhézións receptorának ligandkötésével kezdődik, ezt erősíti a szignáltranszdukció: aktivált trombocitákból trombin és tromboxán A<sub>2</sub>, trombocitákból és az érrendszer sejtjeiből ADP, stresszindukált epinephrin révén [20].

Az érlelmeszesedésben a trombociták aktivációjának folyamata még nem teljesen ismert. A folyamat korai szakaszaiban az alábbi faktorok és események vezetnek trombocita aktivációhoz:

- reaktív oxigénigényökök, melyek az érlelmeszesedéses rizikófaktorok hatására keletkeznek, pl. szuperoxid-, hidroxylgöyök, peroxinitrit
- csökkent endotheliális antitrombotikus aktivitás: NO szintézis, prosztaciklin, CD39, ekto-ADP-áz (ADP-bontó enzim)
- protrombotikus és proinflammatorikus mediátorok szintjének emelkedése: TF, keringő vagy endothelhez kötött kemokinek
- léziók kialakulását követően GPIb – P-selectin, vWF kötés a trombocita korai kötődése, az un. „tethering” során az intakt, de már diszfunkcionális endothelen [20].

A trombocita aktiváció hatással van az érlelmeszesedés progressziójára. A TXA<sub>2</sub> keletkezésének gátlásával pl. jelentősen csökkenthető az érlelmeszesedéses léziók kialakulása. Az aszpirinnak ezt a hatását néhány vizsgálat vitatja, ugyanakkor a makrofágok és simaizomsejtek COX-2 gátlásán keresztül jótékony hatású lehet érlelmeszesedésben. Az aktivált trombociták a fehérvérsejtekkel és az endothellel kölcsönhatásba lépve elősegítik a leukociták érpályából való kilépését [36]. Az alábbiakban a trombocitáknak az atherosclerosis és atherotrombózis szempontjából fontos interakcióit mutatjuk be, a vérlemezkékből származó szolubilis mediátorok, adhézións molekulák és sejtkapcsolatok segítségével.

#### *A trombocitákból származó mediátorok jelentősége érlelmeszesedésben*

Aktiváció hatására a trombocitákból adhezív és proinflammatorikus mediátorok szabadulnak fel, melyek főként a trombociták  $\alpha$ -granulumában tárolódnak. Az így a keringésbe kerülő molekulák közül sok szerepet játszik az érlelmeszesedés gyulladálos folyamataiban.

PF4: Elősegíti az oxLDL kötődését az endothelhez és a simaizomsejtekhez; fokozza a monociták és más leukociták kemotaxisát [84,85].

RANTES: A trombociták felszínéről az érlumen felszínére rakódva fokozza a memóriasejtek és a monociták kemotaxisát [86-89].

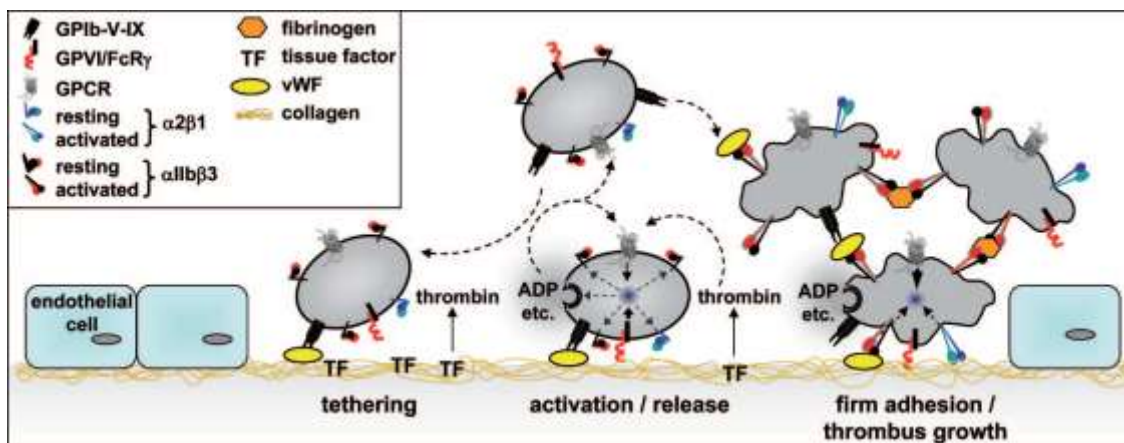
MIP-1 $\alpha$ : CD8+ T lymphociták kemotaxisa

PDGF: Vaszkuláris simaizomsejtek migrációjáért és proliferációjáért felelős növekedési faktor, (emiat összefüggésbe hozzák az intimális hiperpláziával), emellett a monociták kemotaxisát és aktivációját idézi elő. (Mivel az endothelen nincs PDGF receptor, és makrofágok és habos sejtek is képesek PDGF-et szintetizálni, további vizsgálatok szükségesek annak igazolására, hogy az érlemezésben a trombocita eredetű PDGF valóban szerepet játszik.)

IL-1 $\beta$ : Fokozza az endothelsejt adhezivitását [90].

#### *Trombocita adhéziós molekulák a véralvadásban:*

A legtöbb trombocita átlagosan 10 napos élettartama alatt többnyire nem kerül erős adhézió kapcsolatba az endothellel. Amennyiben az endothel sérül és a szubendotheliális szövetek szabaddá válnak, a vérlemezkék nagyon gyorsan aktiválódnak és hozzákötődnek a sérült érfelszínhez. Ebben a folyamatban az első lépés a „tethering”, melyben meghatározó a GpIb/IX/V vWF-hoz kötődése, amely lehetővé teszi a kollagénhez történő erősebb kötődést a GpVI segítségével. Ezt követi a trombociták összekapcsolódása fibrinogén-hidakon keresztül az aktivált GpIIb/IIIa közvetítésével. Az aktivált trombocitákból számos szolubilis mediátor kerül a keringésbe, amely további trombocita-aktivációhoz és még több trombocita adhéziójához, végső soron a trombus növekedéséhez és a vérzés elállásához, kóros esetekben azonban a beszűkült, atherosclerotikus érszakasz elzáródásához vezethet [91,92].



1.1.8 ábra: Trombocita aktiváció és kötődés a sérült endothelhez. Forrás: Varga-Szabo et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008 [92]

*Trombocita adhéziós molekulák az érlemezésben:*

A trombociták nem csak a károsodott endothelhez képesek kötődni. Predilekciós helyeken, pl. artériák elágazásánál a vérlemezkék előszeretettel lépnek kapcsolatba az intakt érfelszínnel. A kapcsolódás első lépése a szelektinek (P- és E-selectin illetve a PSGL-1 vagy a GpIb $\alpha$ ) által mediált, nagyon szigorúan szabályozott, de rövid ideig tartó és rendkívül laza kapcsolat: az ún. tethering (horgonyzás). Ennek következtében a trombocita aktiválódik és lelassul, majd kisebb sebességgel, de még mindig nagy nyíróerők mellett végiggördül az aktivált endothelen (rolling). A gördülés során a vérlemezke még mindig nagyon laza kapcsolatban van az endothellel, amit szintén a szelektinek közvetítenek. A rolling mechanizmusa nagyban függ az endothel aktiváltságától, amelyet fokozhatnak a jelen levő a gyulladásos mediátorok és folyamatok, mint például infekciók, mechanikai stressz vagy ischaemia illetve reperfüzió [91,92].

A gördülés után következik az erősebb (firm) adhézió, amit már integrinek mediálnak. A trombociták sérült érfalhoz kapcsolódása sokat vizsgált és viszonylag jól ismert folyamat, keveset tudunk ezzel szemben a vérlemezkék intakt endothelhez való kötődéséről. A folyamatban mind a GpIIb/IIIa, mind a GpIb $\alpha$  szerepet játszik. Ezt igazolja, hogy a GpIIb/IIIa gátlásával *in vivo* megakadályozható a trombociták érfalhoz tapadása. Ezeket a gátló antitest-darabokat illetve peptideket széles körben alkalmazzák

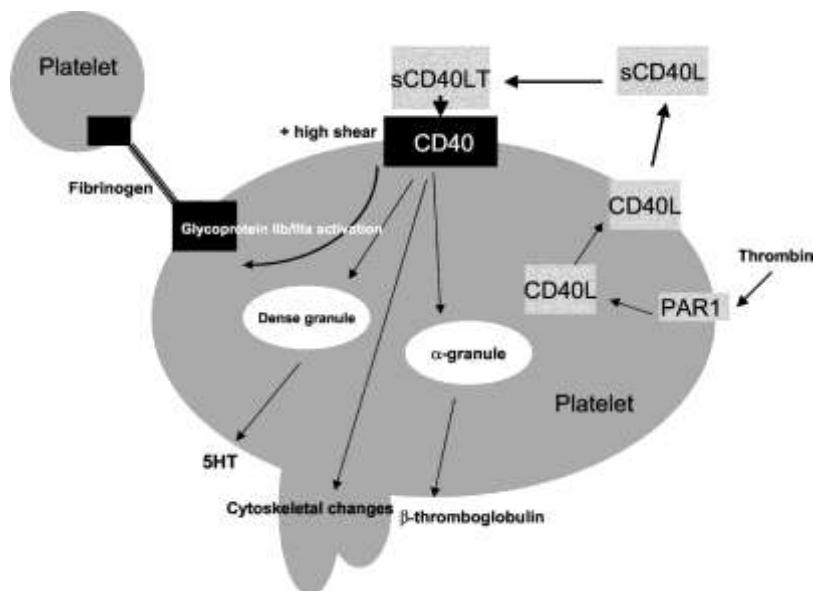
már a klinikai gyakorlatban is a trombociták sérült érfalhoz tapadásának gátlására (ReoPro<sup>®</sup>, Integrilin<sup>®</sup>, tirofiban, stb). *In vitro* vizsgálatok eredményei szerint a GPIIb/IIIa specifikus gátlása a trombocita endothelhez történő átmeneti kötődését részben, míg stabil kötődését szinte teljesen megakadályozza, míg a GPIbα gátlása az átmeneti adhéziót mintegy 85%-kal, a „firm” adhéziót 99%-kal csökkenti [91-93].

*In vitro* és *in vivo* vizsgálatok is igazolják, hogy a vérlemezkék érfalhoz kötődése nagy nyíróerők jelenlétekor és ép endothel mellett is végbemegy. A vérlemezkék a gördülés során és az érfelszínhez való kötődéskor aktiválódnak. A kapcsolat hatására viszont az endothel is aktiválódik és megnövekszik a sejtfelszíni adhéziós receptorok (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin) és a felszabaduló, gyulladásos választ kiváltó szolubilis mediátorok (pl. MCP-1, IL-8, IL-1β, CD40L) mennyisége, elősegítve a leukociták aktivációját és érfalhoz történő migrációját és kitapadását, amit az aktivált trombocitákból felszabaduló mediátorok még tovább fokoznak [36,93].

#### *Trombocita mikropartikulumok*

A mikropartikulumok (ektoszómák) a vérben keringő, 100-1000 nm átmérőjű foszfolipid réteggel határolt vezikulumok, melyek a sejtekből exocitózissal válnak le, és az anyasejtre jellemző antigénprofilot mutatnak. Kóros állapotokban, pl. autoimmun betegségekben, érlemezsedésben, fertőzőes vagy malignus megbetegedésekben számuk jelentősen megnövekszik. Mikropartikulumok keletkezhetnek a sejtek aktivációjakor, pl. gyulladásos, trombotikus hatásokra, nagy nyíróerők következtében, akár csak a sejt élekciklusának különböző fázisaiban; differenciálódáskor, a sejt öregedésekor vagy az apoptózis beindulásakor. A keringésben található mikropartikulumok 70-90%-a trombocitákból származik. Ezeknek a felszínén sokkal nagyobb számban, koncentráltan vannak jelen a trombocita felszíni adhéziós molekulák és gyulladásos mediátorok, amelyek segítségével ezek az apró vezikulumok az aktivált trombocitákhoz hasonló szerepet tölthetnek be a gyulladásos reakciókban és az érlemezsedés folyamataiban, illetve akár csak a vérlemezkék, a keringő leukocitákhoz kötődve hatással lehetnek azok működésére [94-96].

### 1.1.9 A CD40 ligand



1.1.9.1 ábra: CD40-CD40L kapcsolódás hatása a vérlemezkére. Forrás: Freedman J.E. Circ.Res. 2003. [104] A CD40 ligand kapcsolódása részleges aktivációhoz,  $\alpha$ - és denz granulumok felszabadulásához vezet. (sCD40L: szolubilis CD40 ligand, sCD40LT trimer formájú sCD40L, PAR1: proteáz-aktivált receptor, 5HT: szerotonin)

CD40 ligand (CD40L, TRAP, gp39, CD154) egy 33 kD-os transzmembrán protein, mely a tumor nekrosis faktor családba tartozik. Először aktivált T-sejteken írták le 1992-ben [97, 98, 99]. Receptora a CD40, egy 48 kD-os transzmembrán protein, a TNF receptor családba tartozik. A CD40 és ligandja, a CD40L, az érlemezésedéses plakk szinte minden jellemző sejtjén megtalálható, ahol az érlemezésedés irányába mutató, trombotikus és gyulladásos hatásokat közvetít: monocitákon és makrofágokon fokozza az adhézións molekulák, kemokinek és TF megjelenését [100-102]. Az endothelen jelen levő CD40 ligandkötés hatására fokozódik az adhézións molekulák (E-selectin, VCAM-1, ICAM-1) expressziója, a kemokinek (IL-8 és MCP-1), citokinek, pl. IL-6, TF megjelenése, és a reaktív oxigéngyökök képzése [103-106]. A CD40 ligand fokozza az MMP-k aktivitását is. Egerekben a CD40 ligand génjének kiiktatásával, illetve nem génkiütött egerek CD40 ligand-ellenes kezelésével az érlemezésedéses

plakkok mérete csökken, a plakkok kötőszövetes állománya megnő, a betegség lefolyása enyhül, melynek jelentős klinikai, terápiás vonzata lehet [107].

A CD40-CD40L kapcsolat fontos szerepet játszik a gyulladásos és érrelmeszesedéses folyamatokban. Itt csak azokra a funkciókra térünk ki, amelyek az érrelmeszesedés, illetve a trombociták és leukociták aktivációja szempontjából fontos lehet.

Becslések alapján a keringésben jelen levő CD40 ligand 95%-ban trombocitákból származik. A CD40 ligand a trombociták citoplazmájában tárolódik, aktiváció hatására nagyon gyorsan megjelenik a trombocita felszínén [108]. A felszíni CD40 ligand (trimer) egy bizonyos idő után (percek-órák) hasításra kerül és így szolubilis formában (sCD40L) monomerként kerül a keringésbe. A két forma közti funkcionális különbségek még nem teljesen tisztázottak, de leírták, hogy a membránkötött, trimer CD40 ligand endothelen gyulladásos választ vált ki, ami viszont a szolubilis formánál nem volt igazolható. A CD40/CD40 ligand interakció gátlása egyes eredmények alapján drámaian csökkenti az atherosclerosis progresszióját [102].

Humán mintából végzett mérések alapján a CD40 ligand a keringésben kb. 50 ng/ml-es koncentrációban van jelen, de trombotikus vagy gyulladásos elváltozások jelenlétekor lokálisan nagyobb koncentrációk is létrejöhetnek. In vitro vizsgálatok alapján [109] a CD40 ligand már 100 ng /ml-es koncentrációban aktiválja a trombocitákat. A szolubilis CD40 ligandot emelkedettnek találták kardiovaszkuláris betegségben [110-112] és összefüggést találtak a CD40 ligand plazmaszintje és a későbbi kardiovaszkuláris kockázat között látszólag egészséges nőkben [110].

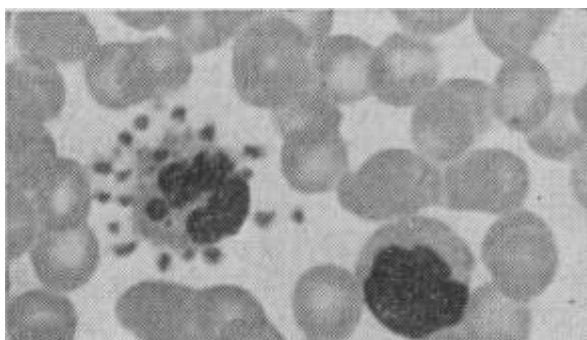
Inwald és munkatársai eredményei alapján a CD40 ligand az alábbi változásokat hozza létre a vérlemezkében: a CD40 ligandkötése aktiválja a trombocitákat, ennek hatására megnövekszik a CD62P expressziója, de kisebb mértékben, mint a trombin receptoron keresztül történő aktiváció esetén; a Pac-1 csak minimálisan emelkedik meg a trombinaktivációhoz képest, és a denz granulum felszabadulása is csak ötöde a trombinaktivációkor tapasztaltnak [109,113]. Egyes eredmények szerint a CD40L kapcsolódik a GpIIb/IIIa-hoz és befolyásolja az artériás trombus stabilitását [114]. A

sCD40L jelenlétekor fokozódik a neutrofil leukocita-vérlemezke aggregátum képződése, ha a GpIIb/IIIa legalább kis mértékben aktiválva van. Ez egy részleges és szelektív aktivációra (válaszra) utal, aminek a mechanizmusa még nem ismert, sem az, hogy a trombotikus vagy gyulladásos folyamatokban játszik-e szerepet. PhD munkám során igazoltam, hogy a CD40 ligand részt vesz a leukocita-trombocita kapcsolatokban, melynek egyik résztvevője éppen a GpIIb/IIIa integrin, ami magyarázatot adhat a fenti eredményekre.

## ***1.2 Monocita - trombocita komplexek és jelentőségük az érlelmeszesedésben***

A fehérvérsejtek és a vérlemezék a keringésben aktiváltsági szintjüktől függően aggregátumokat alkotnak. A múltban a legtöbb kutatás a neutrofilek és trombociták kölcsönhatásaira irányult, ma már azonban tudjuk, hogy az érlelmeszesedés progressziója szempontjából a monocitákkal való kapcsolat nagyobb jelentőségű [115].

Az első, a perifériás vérben talált trombocita-leukocita aggregátumokat 1963-ban, a British Medical Journal-ban írták le egy 14 éves fiú vérének vizsgálva [116,117]. Ekkor a vérlemezék neutrofilekhez való kötődését ritka leletként jellemezték, és in vitro jelenségnek tartották.



1.2.1 ábra: Neutrofil-trombocita heteroaggregátum. Forrás: E.J Field, Ian MacLeod: Platelet Adherence to Polymorphs, British Medical Journal, 1963 [116]

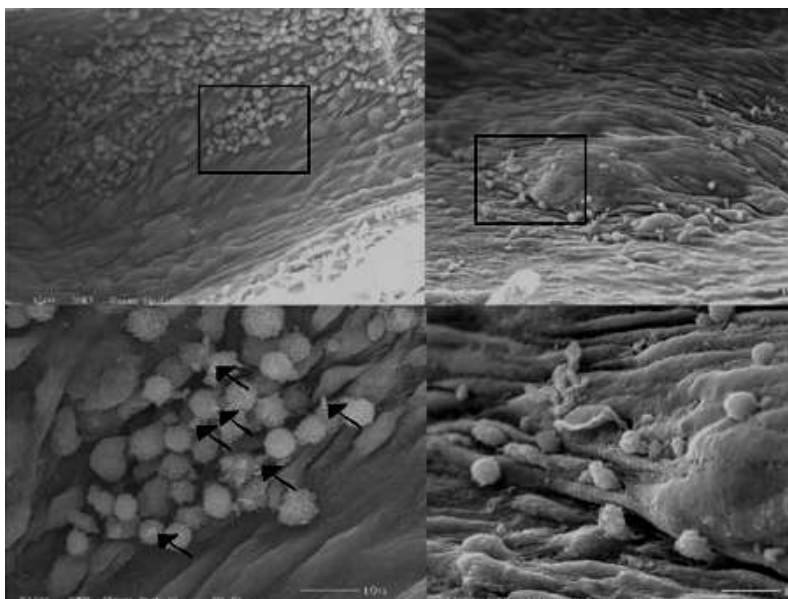
Azóta számos kórképben leírták, hogy megemelkedik a keringő leukocita-trombocita komplexek száma [23,24,50,118-121]. Keletkezésük okai, körülményei és következményei azonban továbbra is a vizsgálatok középpontjában állnak.

A leukocita-trombocita komplexek két lépésben alakulnak ki. Az első, meghatározó lépés a P-selectin és ligandja közötti kapcsolat [1,74,75]. A P-selectin aktivált trombociták és stimulált endothelsejtek felszínén expresszálandó adhéziós molekula, mely a leukociták e sejtekhez való kötődését mediálja. A hozzá kapcsolódó molekula a leukocitákon a P-selectin glikoprotein ligand (PSGL-1, CD162), mely szénhidrátvázú, szialinsav- és proteintartalmú molekula. Ez a kötődés esszenciális a leukocita-trombocita komplex kialakulása szempontjából, hiszen mind P-selectin, mind PSGL-1 ellenes antitesttel sikerült megakadályozni a komplexek kialakulását [115,122].

Második lépésként a komplex a leukocitákon aktiváció hatására működésbe lépő Mac-1 (CD11b/CD18) integrin közreműködésével stabilizálódik, mely a leukociták endothelhez való rögzülését is mediálja. A CD18 integrin komplexképződésben betöltött szerepét anti-CD18 gátló antitestek használatával igazolták [123]. Aktiválatlan monocitákon azonban nem sikerült a CD18- ellenes antitesttel az aggregátum szint csökkenést előidézni, ami arra utal, hogy ez a mechanizmus csak a monocita aktivációt követően lép életbe. Erőteljes nyíróerők fellépésekor a CD18 affinitása csökken, amely a túlzott mértékű aggregátumképződést megakadályozza [115].

A vérben keringő leukociták és trombociták reverzibilis aggregátumokat alkotnak. Egyelőre vitatott, hogy a komplexek mennyi ideig tartózkodnak a keringésben. In vitro vizsgálatok szerint a komplexek életideje 15-20 perc körül mozog, mely a Mac-1 gátlásakor 1-2 percre csökken [123]. In vivo adatok alapján azonban a monocita-trombocita komplexek nagyon hamar eltűnnek a keringésből, és az érfalhoz tapadnak. Huo és munkatársai igazolták is az endothelhez kitapadó monociták felszínén a trombociták jelenlétét [86].





1.2.2 ábra: Az érfalhoz kitapadó monocitákon jelen vannak a trombociták. Forrás: Huo et al. Nature Med. 2003 [86]

Az aggregátumok száma a szervezet nyugalmi állapotában csekély, szintjük azonban a trombociták és leukociták aktivációját követően azonnal megemelkedik. A keringő monocita-trombocita aggregátumok mennyisége a vizsgálatok szerint érzékenyebben jelzi a trombocita aktivációt, mint a korábban az aktivitás jellemzésére használt trombocita felszíni P-selectin [118]. A trombociták aktiválását követően akár három sejttípust, azaz trombocitákat, monocitákat és neutrofileket tartalmazó komplexek is megfigyelhetők, melyekben a trombociták hidat képeznek a két fehérvérsejt között. Leggyakrabban azonban a monocita-trombocita komplexek emelkedése figyelhető meg.

A leukociták és trombociták közti kapcsolódást számos tényező elősegítheti: ilyenek pl. a gyulladásos és protrombotikus állapotokban felszabaduló mediátorok [118], a fertőzések [121], hiperszenzitív reakciók [119], emelkedett vércukorszint [120, 50] és vérsírszintek [124] és a nagy nyíróerők [23,24]. Akut kardiovaszkuláris [10,11,125-127] és cerebrovaszkuláris [128-130] történések során szintén jelentősen megemelkedik a keringő leukocita-trombocita komplexek mennyisége, különösen a monocita-trombocita heteroaggregátumoké. A monocita-trombocita aggregátumok

szintjének mérése éppen ezért az érlemeszesedés, illetve a szövődményes állapotok, például instabil angina és AMI nyomon követésére alkalmas paraméternek bizonyult, sőt, a kölcsönhatások gátlása néhány esetben a trombotikus események, illetve a reocclusio előfordulásának csökkenését vonta maga után [131,132].

A monocita-trombocita kapcsolatoknak több szempontból is jelentősége van az érlemeszesedés progressziójában. A kapcsolódás eredményeként a komplex alkotói tovább aktiválódnak, fokozódik a gyulladásos és protrombotikus citokinek felszabadulása és a sejtfelszíni adhéziós molekulák expressziója. Ebből adódik, hogy a vérlemezkét kötő leukociták hajlamosabbak lesznek az endothelhez történő kitapadásra.

Huo és munkacsoportja szerint monocitákhoz kapcsolódó trombociták mediátorai és a közvetlen kapcsolat révén is elősegítik a monociták kitapadását és transzendotheliális migrációját [86]. A monociták emellett előszeretettel kapcsolódnak vérlemezkékkel borított felszínekhez, így például érsebészeti beavatkozásokat követően az endotheltől megfosztott, trombocitákkal fedett érfelületen tapadnak ki nagy számban. Az érfalhoz kötött, aktivált vérlemezkék adhéziós molekuláik révén (P-selectin, GpIb $\alpha$ , JAM-3, ICAM-3, stb.) ideális környezetet biztosítanak a leukociták kitapadásához. Ebben a P-selectin-PSGL-1 kötés és valószínűleg a GpIIb/IIIa-hoz kötött fibrinogén illetve a GpIb $\alpha$ -hoz kötött kininogén, mint hídmolekulák is szerepet játszanak. Kísérletes adatok szerint azonban a monociták erőteljesebben kötődnek a vérben keringő, szabad trombocitákhoz, mint a felszínhez kötöttekhez [86,115,133]. Blokkolási kísérletek alapján valószínűsítik, hogy a keringő monocita-trombocita komplexek kialakulásában is jelentősége van a GpIb $\alpha$ -nak, illetve a GpIIb/IIIa-nak.

A leukocita-trombocita kapcsolódás nagyon érzékenyen jelzi a szervezetben zajló változásokat, a leukocitákból és trombocitákból felszabaduló citokinek révén pedig súlyosbítja a gyulladásos folyamatot és a trombóziskészséget. Éppen ezért, a kölcsönhatások megismerése és az aggregátumok meghatározása új lehetőségeket jelent az atherotrombózis korai diagnosztikájában és terápiájában.

### ***1.3 P-selectin***

A szelektinek (CD62), mint az E-, L- és P-selectin, kalciumfüggő adhéziós molekulák, melyek a leukociták, trombociták, tumorsejtek és endothelsejtek közti adhezív interakciókban vesznek részt. A szelektinek a vérben keringő aggregátumok kialakulásához is szükségesek: a leukociták és trombociták kapcsolódásakor a P-selectin PSGL-1-hez kötődése az első, meghatározó lépés.

A P-selectin (CD62P, GMP-140) az aktivált trombocitán és endothelen jelen levő adhéziós molekula. Mindkét sejttypusban ismert szolubilis és membránkötött formája is, ez utóbbi egyetlen, 789 aminosavból álló polipeptidláncból áll. A szolubilis forma az mRNS alternatív splicing-jének eredményeként jön létre, mintegy 40 aminosavval rövidebb, mint a transzmembrán változat és ugyanúgy képes a leukocitákhoz kötődni, így a sejthez kötött formával szemben, valószínűleg anti-adhezív illetve szabályozó feladatokat lát el [74].

A P-selectin nyugalmi állapotban nincs jelen a sejt felszínén; a trombocita  $\alpha$ -granulumban ill. az endothel Weibel-Palace testecskéiben tárolódik. Trombotikus illetve gyulladásos mediátorok hatására a trombocita illetve az endothel aktiválódik, és a sejtben tárolt P-selectin exocitózissal rendkívül gyorsan a sejt felszínére kerül [91].

Az aktivált trombocitán illetve endothelen megjelenő P-selectin a leukociták P-selectin glikoprotein ligandjához (PSGL-1) kötődik, mely a legtöbb leukocitán (Th1 sejteken, neutrofil, eozinofil és bazofil granulocitákon) megtalálható [74,91].

Az endothel P-selectinjén a vérlemezkék is képesek végiggördülni (rolling), ez arra utal, hogy a trombocitán is található megfelelő partner a P-selectin számára; in vitro vizsgálatok alapján a trombocita felszínén jelen levő PSGL-1, a glikoprotein Ib $\alpha$  illetve egy 28 kDa molekulatömegű glikoprotein is képes a P-selectinhez kötődni. Az aktivált trombocitákon megjelenő P-selectin ezáltal stabilizálja a trombocita aggregátumot és fontos meghatározója a trombus nagyságának.

*P-selectin szerepe a gyulladás folyamatában*

A leukociták érfalhoz tapadásában a szelektinek, így a P-selectin jelenléte is alapvető fontosságú. Ezek a molekulák felelősek a leukociták elsődleges kapcsolódásáért az érfalhoz (tethering), az érfalon való végiggördülésért (rolling) és a kezdeti gyenge adhézióért, ezzel lehetővé teszik a stabilabb kötődést az integrineken keresztül. Ezért mind P-selectin-, mind pedig PSGL-1-knockout egerekben sérül a rolling és az extravazáció folyamata [74-76,134]. Emellett neutrofileken kimutatták, hogy a P-selectin és a PSGL-1 kapcsolódása intracellulárisan az  $\alpha_M\beta_2$  integrin (Mac-1) intermedier aktivációs állapotát idézi elő, mely az extracelluláris hatásokkal együtt elősegíti a sejtek optimális adhézióját.

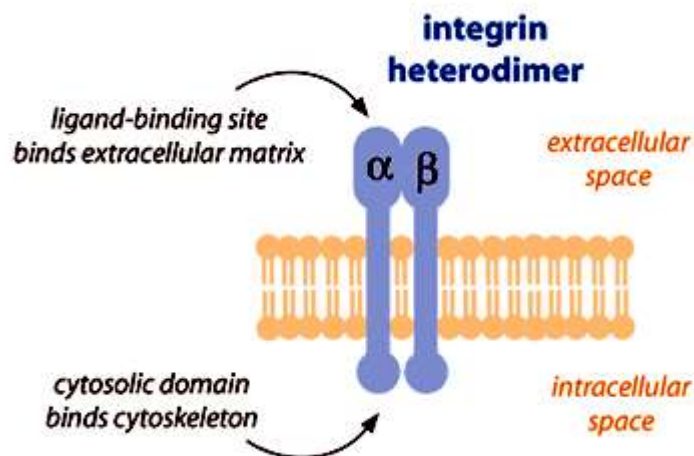
*P-selectin szerepe a trombózisban*

A P-selectin trombusképződésben betöltött szerepe egyelőre kevésbé ismert. Egyre több kutatás számol be azonban a trombociták és leukociták kapcsolódásának jelentőségéről, ezen keresztül pedig a molekula hemosztázisban betöltött szerepéről. Ezt igazolja, hogy az aktivált trombocitákon levő P-selectin elősegíti a vérben keringő leukociták, többek között a monociták trombushoz kapcsolódását és aktiválódását. A folyamatban a monociták TF expressziója megnövekszik és egyre több a PSGL-1 tartalmú mikropartikulum fűződik le, és szignifikánsan több fibrin rakódik le a növekvő trombusban [74]. Állatkísérletes modellekben a P-selectin gátlásakor csökkent trombusképződés, megnövekedett vérzési idő és véralvadási zavarok voltak megfigyelhetők. [135].

**1.4 A Mac-1 integrin**

Az integrinek egy  $\alpha$  és egy  $\beta$  alegységből álló, heterodimer glikoproteinek. A monocita Mac-1 integrin ( $\alpha_M\beta_2$  integrin, complement receptor 3 (CR3), CD11b/CD18, Mo1) a  $\beta_2$  integrincsalád tagja, akárcsak az LFA-1 (lymphocyte function antigen-1, CD11a/CD18) és a protein 150,95 (p150,95, CD11c/CD18). Az ide tartozó molekulák szerkezetében közös a  $\beta$  alegység (CD18), amely nem kovalens kötéssel kapcsolódik egy egyedi, de egymással nagy hasonlóságot mutató alfa alegységhez (CD11a, b vagy c). [136] Ezt a három molekulát a neutrofilek adhézió funkcióiért felelős membrán

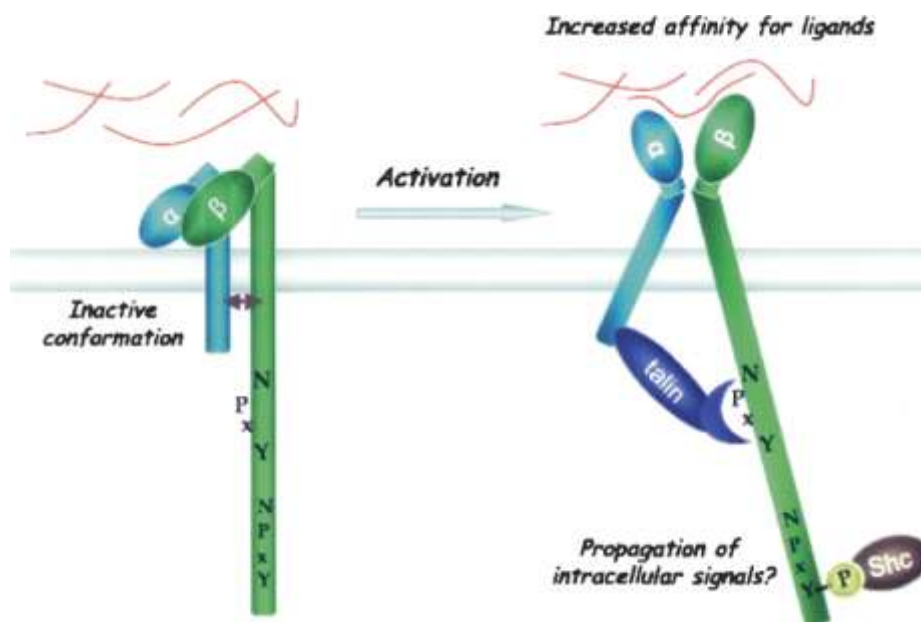
glikoprotein komplexként írják le, melynek szerepe van a leukociták aggregációjában, kemotaxisában, fagocitózisában, az endothelhez és idegen felületekhez való adhéziójában [137].



1.4.1 ábra: Az integrinek szerkezete. Forrás: Eslami A: The role of integrins in wound healing. The Science Creative Quarterly 2011;6. A heterodimer szerkezetű integrin extracelluláris része az extracelluláris ligandot köti, míg intracelluláris doménje a citoszkeleton elemeihez kötődik.

A Mac-1 (CD11b/CD18) az emlős polimorfonukleáris leukocitákon (PMN), a legtöbb mononukleáris fagocitán és a természetes ölósejtek (NK sejtek) felületén fordul elő, kulcsfontosságú szerepet játszik a leukocitáknak az endothelhez és a sérült, trombocitákkal fedett felületekhez történő kitapadásban [43,138].

Az integrinek egy intracelluláris vezikulumban tárolódnak, majd aktiváció hatására kerülnek a sejtfelületre. Alapállapotban inaktív formában vannak jelen. Egy tirozin-kináz dependens aktiváció hatására kerülnek aktív konformációjú állapotba [139,140]. Így válik szabaddá a kötőfelület (I domén), amely az  $\alpha_M$  alegységben belül helyezkedik el.



1.4.2 ábra: Az integrinek aktivációja. Forrás: Yuliya Pylayeva<sup>1</sup> and Filippo G. Giancotti: Development requires activation but not phosphorylation of  $\beta 1$  integrins. Aktiváció hatására az integrin térszerkezete megváltozik, ligandkötési affinitása sokszorosára nő.

A Mac-1 integrin esetén a mind a szolubilis, mind a sejtfelszíni ligandok megkötése az I doménhez köthető, melyet a fibrinogén, ICAM-1, iC3b és a neutrofil-neutrofil adhézioért felelős molekula kapcsolódásának vizsgálatakor írtak le [141,142]. Az I domén egy 200 aminosavból álló szekvencia a Mac-1  $\alpha$  alegységén, amelynek működéséhez a molekula  $\text{NH}_2$ -terminális vége és két vegyértékű kationokat kötő régiója is hozzájárul [143]. Ezen keresztül a Mac-1 számos, az érlelmeszesedés progressziója szempontjából fontos folyamatban játszik szerepet, így például a monocita endothelhez és trombocitákkal fedett felszínekhez való kitapadásában, és a keringő sejtek közötti kapcsolódásban, így a monocita-trombocita komplexek kialakulásában is. Az integrin működéséhez szükséges két vegyértékű kationok jelenléte. Erre utal, hogy pl. EDTA jelenlétében a monocita-trombocita aggregátumok mennyiségének jelentős, a bazális szinthez közeli értékre való csökkenése volt észlelhető.

A Mac-1 legismertebb ligandjai az iC3b, a fibrinogén, az intercelluláris adhézio molekula-1 (ICAM), a vitronektin, az aktivált X faktor, a heparin, a trombocita GpIb $\alpha$ , a JAM-3 és a lipoprotein (a).

| Ligand          | Funkció  |
|-----------------|--|
| iC3b            | opszonizált részecskék megkötése, fagocitózisa |
| fibrinogén      | adhézió  |
| ICAM-1          | endothel adhézió                               |
| vitronectin     | adhézió  |
| Xa faktor       | véralvadás                                     |
| heparin         | véralvadás                                     |
| Gplba           | leukocita-trombocita aggregáció                |
| JAM-3           | endothel adhézió                               |
| lipoprotein (a) | endocitózis                                    |

1.4.1 táblázat: A Mac1 ligandjai és a ligandkötéssel kapcsolatban leírt szerepei

Ezek mellett az utóbbi időben több ligand is azonosításra került, melyeknek jelentősége még nem teljesen tisztázott. PhD munkám részeként, freiburgi tanulmányutam során a CD40 ligandot a Mac-1 új ligandjaként sikerült azonosítanom. Kutatócsoportunk további munkája során a CD40 ligand-Mac-1 kapcsolódás jelátvitelben betöltött szerepére is fény derült.

Stimuláció következtében a leukociták Mac-1 receptor szintje megemelkedik, konformációja megváltozik, ami az adhéziót és az aggregátumok stabilizációját elősegíti. Érdekes módon, több vizsgálatban is kimutatták, hogy a sejtfelszíni Mac-1 expresszió mértéke nem meghatározó az endoteliális adhézióban. A folyamatban nagyobb szerepet tulajdonítanak az integrin aktivált konformációjának [137], ezért nagy jelentősége van az integrin aktivációját jelző módszereknek. PhD munkám egy részét képezte egy a freiburgi laborban kifejlesztett, Mac-1 aktivációs-specifikus antitest tesztelése, illetve a monocita Mac-1 aktivitásának vizsgálata az új antitest segítségével.

A Mac-1 integrin expresszióját számos tényező befolyásolja. Emelkedett Mac-1 szinteket találtak például koronáriabetegekben, koronária stentelést követő restenosisban [126], diabéteszben [120], emelkedett koleszterinszintek esetén [144], de a fizikai aktivitás, dohányzás és számos más faktor is befolyásolja az integrin megjelenését. Aktivációjával kapcsolatban azonban kevesebb adat áll rendelkezésre.

### ***1.5 Klinikum, terápia***

Kardiovaszkuláris intervenciók és akut kardiovaszkuláris vagy cerebrovaszkuláris események következtében megnő a keringő sejtes elemek aktivitása. Előrehaladott érrelmeszesedésben azonban közvetlen kiváltó ok nélkül is emelkedett trombocita-aktiváció mérhető. Ez az aktiváció egyrészt jelzi a szervezetben zajló változásokat, másrészt hajlamosít a további komplikációk kialakulására. Az érrelmeszesedés progressziójának lassítására és az akut történések kezelésére használt gyógyszeres terápiának óriási irodalma van. A gyógyszerek egy része kifejezetten a keringő sejtes elemek, különösen a trombociták gátlását célozza [1,2]. Más esetekben mintegy mellékhatásként jelentkezik a keringő sejtes elemekre kifejtett hatás, ilyen pl. a statinok hatása a monociták CD11b expressziójára [42].

Mivel a keringő monocita-trombocita aggregátumok nagyon érzékenyen jelzik a trombociták aktivitását, ezért a trombociták működésére ható gyógyszerek sok esetben a monocita-trombocita aggregátumok számának csökkenését idézik elő, bár ennek pontos mechanizmusa a legtöbb esetben nem ismert. Ennek megfelelően, klinikai vizsgálatokban, GpIIb/IIIa gátló kezelés alkalmazásakor mellékleletként a monocita-trombocita aggregátumok csökkent mennyisége volt megfigyelhető, ennek okát és jelentőségét azonban nem sikerült tisztázni. PhD munkám során igazoltam, hogy a GpIIb/IIIa részt vesz a monocita-trombocita kapcsolatok stabilizálódásában, ami magyarázatot ad a klinikumban tapasztalt jelenségre.

Más esetekben, az érrelmeszesedés progresszióját gyorsító betegség kezelésekor figyelték meg a trombociták aktivitásának csökkenését, például diabéteszes betegek inzulinkezelésekor. PhD munkám során ezért a diabéteszes betegcsoporton végzett mérésekbe csak inzulinkezelésben nem részesülő betegeket vizsgáltam.



## 2. Célkitűzések

### ***2.1 Monocita Mac-1 aktivitásának jellemzése aktiváció specifikus antitesttel***

Bizonyos receptorok és adhéziós molekulák két konformációs állapotban léteznek: az aktiválatlan forma nem vagy kevéssé képes a ligandkötésre. A különböző térszerkezetek különböző funkcióval is bírhatnak. A receptorok különböző konformációihoz szelektíven kötődő antitestek segítségével új szemszögből tanulmányozhatjuk a receptor-ligand interakciókat, illetve egészen új lehetőségeket teremtenek a diagnosztika és a terápia vonatkozásában.

Az integrinek családjába tartozó adhéziós molekulákban a sejt aktiválódása során konformációváltozás következik be, ennek hatására a sejtfelszíni molekula ligandkötési képessége sokszorosára nő. A Mac-1 adhéziós integrin esetében emellett azt is kimutatták, hogy a leukociták Mac-1-en keresztül történő kitapadásában az expresszió emelkedésével szemben nagyobb jelentősége van az integrin aktivációjának. A klinikai gyakorlatban nagy jelentősége van a különböző receptorok és adhéziós molekulák blokkolásának, melynek során az aktivációspecifikus antitestek lehetővé teszik az aktivált sejtek illetve molekulák specifikus gátlását, anélkül hogy a nyugvó sejtek funkcióját gátolnák.

Freiburgi munkacsoportunk a 3. fejezetben röviden ismertetett Phage-display módszerével kifejlesztett egy aktivációspecifikus antitestet, amely kizárólag a Mac-1 integrin aktivált konformációjához kötődik. Mivel a Mac-1 integrin adhezivitása nem a sejtfelszíni expressziótól, hanem az integrin aktivációjától függ [41], a Mac-1 aktivitását jelző antigén az integrin felszínén jobb indikátora lehet a monociták adhéziós készségének megítélésére, mint a CD11b sejtfelszíni expressziója. Freiburgi kutatómunkám részét képezte ennek az új antitestnek a tisztítása, tesztelése, valamint ennek segítségével a monocita Mac-1 receptor működésének tanulmányozása.

## ***2.2. A CD40 ligand és a Mac-1 kapcsolatának vizsgálata***

Az atherosclerotikus plakk sejtes elemei, mint az endothel, a makrofágok és simaizomsejtek, mind a CD40-t mind a CD40 ligandot prezentálják. Ezeken a sejteken a CD40 ligand gyulladásos választ vált ki, megemelkedik a sejtfelszíni adhéziós molekulák száma, a prokoaguláns és gyulladásos mediátorok, kötőszövetes mátrixot bontó enzimek mennyisége. A CD40 ligand gátlása számottevően csökkenti az atherosclerotikus plakk progresszióját. Freiburgi munkacsoportunk munkája során azonban a CD40L-nek egy a saját receptorától, a CD40-től független funkciójára derült fény. Állatkísérletes modellünkben a CD40 knock out egerekben nem volt kisebb az érlemeztesedés mértéke, mint a kontrollcsoportban. A CD40 ligand gátlásával viszont sikerült visszaszorítani az érlemeztesedés progresszióját, ami arra utal, hogy a CD40 ligand nem csak saját receptorán keresztül hat.

A CD40L szerkezeti hasonlóságot mutat a fibrinogénnel és kötődik annak trombocita receptorához, a GpIIb/IIIa-hoz. Az egyik lehetséges kapcsolódási partner ezért a fibrinogén leukocitákon található receptora, a Mac-1 (CD11b/CD18) integrin. Vizsgálatunkban ezért a CD40 ligand és a Mac-1 integrin interakciójának vizsgálatát tűztük ki célul az alábbi szempontok alapján:

- A CD40 ligand és a Mac-1 monocita adhéziós receptor közti kapcsolat vizsgálata, jellemzése.
- Kötődés és bloká- vizsgálatok: specificitás és kompetitív antagonizmus a CD40L és a Mac-1 receptor ismert ligandjai közt.

## ***2.3 A Mac-1 integrin és ligandjai a monocita - trombocita kapcsolatokban***

A leukocita-trombocita komplexek képződésének első lépése a P-selectin-PSGL-1 kapcsolat. Néhány vizsgálat azonban arra utal, hogy a szelektinek blokkolása nem gátolja meg teljes mértékben az aggregátumok képződését [123]. Konstantopoulos és munkatársai kimutatták, hogy a Mac-1 (CD11b) integrin is részt vesz ebben a kapcsolódásban: stabilizálja a PMN leukocita-trombocita aggregátumokat, és ezért a funkcióért az integrin I doménje a felelős [145]. Megint mások utaltak arra, hogy más környezetben, leukociták és az endothelt imitáló, ICAM-ot prezentáló sejtek is

alkothatnak heteroaggregátumokat, amelyek képződéséhez a szelektinek jelenléte nem feltétlenül szükséges [22,146].

A monocita-trombocita komplexek képződésének vizsgálatakor néhány kísérletben úgy találták, hogy a fibrinogén, illetve esetleg más molekulák jelenléte szerepet játszhat a kapcsolódásban, mivel ezek hiányakor kisebb mértékű leukocita-trombocita aggregáció volt megfigyelhető, a folyamatban részt vevő receptorokat, és a fibrinogénnek a komplex képződésben betöltött szerepét azonban sem sikerült tisztázni.

Egyedi rendszerünkben, Mac-1 prezentáló CHO sejtekkel végzett vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy a Mac-1 önállóan, szelektinek közvetítése nélkül is képes-e kapcsolatot létesíteni a trombocitákkal. Vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan is, hogy a leukocita-trombocita komplexek képződése során a leukocita Mac-1 integrin milyen trombocita receptorról lép kapcsolatba, illetve, hogy a Mac-1 ligandjai, mint a fibrinogén és a CD40 ligand részt vesznek-e a monocita-trombocita komplexek képződésében.

#### ***2.4 A Mac-1 integrin viselkedése II típusú diabéteszben***

A cukorbetegség sokféleképpen hat az érrelmeszesedés progressziójára és a folyamatban résztvevő sejtekre. Diabéteszben a lipid- és cukoranyagcsere változásainak hatására protrombotikus, proatherogén környezet alakul ki: megnő a keringő gyulladásos citokinek mennyisége és a keringő sejtek aktivitása, megemelkedik a leukocita-trombocita, elsősorban a monocita-trombocita aggregátumok száma. A keringő komplexek mennyisége irodalmi adatok alapján összefüggést mutat a vércukorszinttel. Emellett kardiovaszkuláris illetve vesebetegséggel szövődött cukorbetegségben megnő az endothel és a leukociták adhézis receptorainak expressziója [49].

A sejtkultúrás vizsgálataink eredményei alapján arra következtettünk, hogy a CD40 ligand szerepet játszik a monocita-trombocita kapcsolatokban. A következőkben arra kerestük a választ, hogy a CD40 ligand plazmaszintje korrelál-e a monocita-trombocita komplexekkel, illetve hogy a Mac-1 integrin szintje hogyan változik diabéteszes betegcsoportban. A vizsgálat céljára kardiovaszkuláris szövődményektől mentes diabéteszes betegeket választottunk, a monocita-trombocita aggregátumok

szintje mellett a gyulladásos paraméterek szintjét, azoknak a komplexképződéssel való összefüggését is vizsgáltuk.

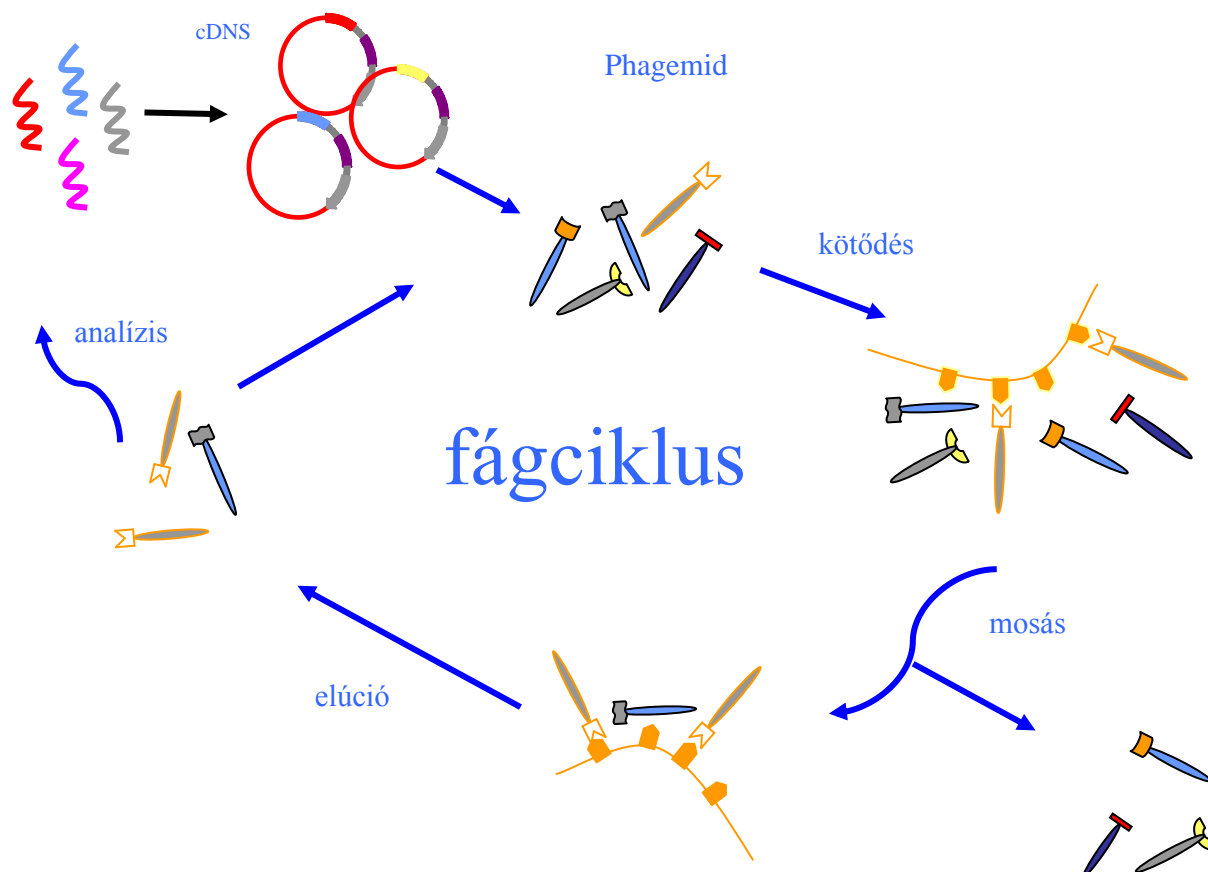
### 3. Módszerek

#### 3.1 *Phage-display, antitest válogatás*

Az antitest kifejlesztéséhez a Phage display módszert használtuk. Mivel az új antitest kifejlesztése során csak a tesztelésben vettem részt, az antitestfejlesztésnek itt csak az elvét mutatom be röviden.

A Phage display módszere kiválóan alkalmas a ligand-receptor interakciók tanulmányozására, új lehetőséget teremtve az alapkutatás, a diagnosztika és a terápiás beavatkozások számára.

Az immunglobulinok variábilis régióiban megtalálható a humán fehérjét felismerő antitestek teljes listája. A módszer elve, hogy az immunglobulinok variábilis régióit kódoló szekvenciákat bakteriofágok genetikai állományába építve fágkönyvtárak hoznak létre, amiből kiválasztható a kívánt fehérjét felismerő antitest. A természetes fágkönyvtárban (natural library) a humán limfocita nehéz és könnyű láncot kódoló cDNS szerepel (ez a könyvtár mintegy  $1,8 \times 10^9$  antitestet prezentál), a szintetikus könyvtár (synthetic library) randomizált H-CDR3 régiókat tartalmaz (mintegy  $6,1 \times 10^8$  molekulát prezentál). A cDNS ezután beépítésre kerül a bakteriofágba (phagemid vector), így a bakteriofág felszínén megjelennek az antitestek. A bakteriofágokat baktériumban szaporítják, és a kívánt célmolekulát prezentáló felszínen/sejteken válogatják: a célmolekulához nem kötődő bakteriofágokat mosással eltávolítják, majd a célmolekulához kötött elemeket leoldják (elúció). Az eluált terméket tesztelik. A fágciklust többször megismételve viszonylag nagy tisztaságú antitestet kapunk a kívánt fehérjéhez.



3.1.1 ábra: Fágciklus. A természetes fágkönyvből származó szekvenciákat Phagemid vektorba integráltuk, majd a fágciklus segítségével válogattuk. Első lépésként (kötődés) kiválogattuk a Mac-1 integrin aktivált konformációjához kötődő formát, a felülúszóban maradt fágokat mosással távolítottuk el. A következő lépésben (elúció) a Mac-1 aktivált formájához kapcsolódó elemeket eluáltuk, centrifugálás után a felülúszót használtuk. A fágciklus többszöri ismétlésével kiválasztható az aktivált Mac-1 integrinhez specifikusan kötődő antitest, és csökkenthető a szennyeződés mennyisége.

A Phage display során természetes fágkönyvtárból a Mac-1-hez kötődő antitesteket válogattunk ki. Ezt követően, a fágciklust megismételve, az alább részletesen jellemzett, a Mac-1 receptort konstitutívan aktivált állapotban expresszáló CHO sejtvonal segítségével kiválasztottuk az aktivált formához kötődő antitesteket. Ennek során az aktiválatlan formához kötődő bakteriofágokat centrifugálással eltávolítottuk, a következő lépésben pedig a felülúszóban maradt fágokat az aktivált formához való kötéssel választottuk ki.

Az antitest tesztelésére tisztított monocitákat és a CHO sejtvonalat használtuk. A kipróbálást áramlási citometriával végeztük, az alábbiak szerint: a monocitákat

egészséges önkéntesek véréből, a CHO sejteket a sejt kultúrából izoláltuk, a lentebb leírt módszerekkel.

### ***3.2 Citometriás és adhézión kísérletek***

#### ***3.2.1 Trombociták és monociták izolálása és aktiválása***

A trombocitadús plazmát az alábbiak szerint készítettük elő: egészséges, gyógyszert nem szedő önkéntesek vérének citrátos csőbe véve, 1000 rpm-en 10 percig centrifugálva trombocitadús plazmát (PRP) nyertünk. Az izolált trombocitákat PRP-ből, gél-filtrációval (Sigma-Aldrich Chemie-től származó izoláló kit segítségével) állítottuk elő, melyeket PBS-el hígítottunk, és 5  $\mu$ M ADP-vel aktiváltunk. A monocitákat hasonlóan, emberi vérből Ficoll-al történő centrifugálással nyertük, PBS-el hígítottuk és 10 percig PMA-val (100 ng/ml) inkubáltuk a megfelelő aktiválás elérésére.

#### ***3.2.2 Sejt kultúra***

Nem aktivált, „vad” típusú Mac-1-et (wild-type Mac-1, CHO-Wt-Mac-1) illetve konstitutívan aktivált Mac-1-et (CHO-del-Mac-1) prezentáló CHO sejteket tenyésztettünk DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tápoldatot, 10% FCS-t (fetal calf serum), L-glutamint, nem-esszenciális aminosavakat, 1% penicillin/streptomycint, 700  $\mu$ g/ml geneticint és 250  $\mu$ g/ml zeocint tartalmazó médiumban. A konstitutívan aktivált formát az ezt expresszáló CHO sejtek Mac-1 integrinje  $\alpha_M$  alegységének citoplazmatikus doménjében egy szigorúan konzervatív GFFKR motívum törlésével állították elő [147,148]. A sejteket a kultúrából tripszines lemosással nyertük, majd PBS-el háromszor mostuk.

### **3.2.3 Adhéziós kísérletek**

Az adhéziós vizsgálatokat a monociták esetében az alábbiak szerint végeztük: 96-lyukú ELISA lemezt (Nunc ImmunoPlate, MaxiSorp®) 10 µg/ml humán sCD40 liganddal (R&D) illetve 20 µg/ml fibrinogénnel fedtünk, 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Az aspecifikus kötődést 0,1%-os agarózzal blokkoltuk, PBS-el kétszer átmostuk, majd humán vérből Ficoll-al történő centrifugálással izolált monocitákkal ( $0.7 \times 10^6$ /ml) inkubáltuk 50 percig 37 °C-on. A kötés specificitását anti-Mac-1 antitesttel ellenőriztük (100 µg/ml, Dako, Hamburg, Németország). Ezt követően a lemezt 3x mostuk PBS-el (Sigma), majd permeabilizációs puffert adtunk hozzá (6 mg/ml phosphatase substrate (Sigma), 1% Triton X-100, 50mM sodium acetate, pH 5.5), mellyel 1 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd a lemezt 405 nm-en olvastuk le (Spectramax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Negatív kontrollként 0,1%-os agarózzal bevont felületet használtunk.

A rekombináns Mac-1-et prezentáló CHO sejtek esetében az adhéziós vizsgálatokat az alábbiak szerint végeztük: a CD40 liganddal és fibrinogénnel fedett lemezeket a fentieknek megfelelően készítettük elő. A Mac-1-et nem (CHO), inaktív állapotban (wt) illetve konstitutívan aktivált állapotban prezentáló sejteket (del)  $0,5 \times 10^6$ /ml-es koncentrációban adtuk a lemezre, majd 50 percig inkubáltuk a monocitáknál leírttal azonos körülmények között. A kötés specificitását anti-Mac-1 antitesttel (100µg/ml) ellenőriztük. A kötődést szintén a monocitáknál leírt módon olvastuk le.

### **3.2.4 A CD40 ligand kötődésének vizsgálata áramlási citometriával**

Humán vérből izolált monocitákat humán, rekombináns, FLAG-jelölt sCD40 liganddal inkubáltunk (3 µg/ml, Alexis, Lausen, Svájc) szobahőn 10 percig, anti-Mac-1 (100 µg/ml) antitesttel illetve anélkül (Dako, Hamburg, Németország). A monocitákat CD14 jelöléssel azonosítottuk (PE, Beckton Dickinson, BD, Franklin Lakes, NJ)

### ***3.2.5 Trombocita-sejt aggregátumok analízise áramlási citometriával***

A CHO sejteket és a vérlemezkéket a fent leírtaknak megfelelően izoláltuk, majd 10 percig, szobahőn a megfelelő gátló antitestekkel kezeltük (anti-Mac-1 antitest, 100µg/ml (Dako), integrilin (Essex Pharma GmbH) és anti-CD42b (Immunotech). A Mac-1 ligandok hatásának vizsgálatakor a fibrinogént 10 µg/ml, a sCD40 ligandot 5 µg/ml koncentrációban adtuk a sejtekhez. A kontroll (CHO), aktiválatlan (wt) és konstitutívan aktivált (del) Mac-1-et prezentáló sejteket PRP-vel illetve izolált trombocitákkal inkubáltuk. Ezután a sejteket fixáltuk (BD Lysing and fixing solution, Beckton Dickinson, BD, Franklin Lakes, NJ) és az aggregátumok mennyiségét flow citométerrel ellenőriztük (FACS Calibur, BD CellQuest program). Ennek során a sejteket a jellemző méret és granuláltsági jellemző alapján azonosítottuk, a trombocitákat anti-CD41 antitesttel (FITC, Beckton Dickinson, BD, Franklin Lakes, NJ) jelöltük. A CHO sejtpopuláción belül megjelenő CD41 pozitív eseményeket aggregátumokként azonosítottuk, a vizsgálat során a sejt-trombocita aggregátumokat mikroszkóp alatt is ellenőriztük. Negatív kontrollként a Mac-1-et nem prezentáló CHO sejteket használtunk.

### ***3.3 Betegcsoport***

A vizsgálatba 14 (életkor: 52,31 +/- 3,14), a vizsgálatot megelőzően legalább 6 hónappal diagnosztizált, 2-es típusú diabéteszes beteget vontunk be, akiknél a vércukorszint diétával és/vagy per os antidiabetikus kezeléssel szinten tartható volt. A vizsgálatot éhgyomorra végeztük. Az inzulinnal kezelt betegeket kizártuk a vizsgálatból. Szintén kizárási kritérium volt az anamnézisben szereplő bármilyen kardiovaszkuláris betegség vagy tünet, vese- illetve májbetegség és a dohányzás. A vizsgált betegek a vérvételt megelőző 14 napon belül nem részesültek gyulladásgátló vagy antitrombotikus kezelésben. A kontroll csoport 14 (életkor: 43 +/- 4,14) egészséges önkéntesből állt, a kizárási kritériumok minden tekintetben megegyeztek a vizsgált betegcsoportéval. A vizsgálatot az Etikai Bizottság engedélyezte, a betegek a vizsgálatot megelőzően szóbeli és írásbeli tájékoztatásban részesültek és a vizsgálatba történő bevonásukkal kapcsolatos Beleegyező nyilatkozatot aláírták.



### ***3.3.1 Laboratóriumi vizsgálatok***

A vércukor, HbA1b, koleszterin (összkoleszterin, HDL, LDL), triglicerid, monocitaszám, trombocitaszám, süllyedés, fehérvérsejtszám és CRP mérését a HM Honvédkórház laboratóriumában végeztük.

### ***3.3.2 IL-6 és CD40L koncentrációk***

A citokinek analíziséhez a vért natív csövekbe gyűjtöttük, lecentrifugáltuk, a plazmát további vizsgálatokig -70°C-on tároltuk. A sCD40L és az IL-6 koncentrációját kereskedelembe kapható ELISA kit segítségével határoztuk meg (IL-6 ELISA-kit: Diagnosticum, sCD40L: R&D)

### ***3.4 Statisztikai analízis***

A statisztikai analízist az SPSS for Windows illetve a SigmaStat szoftverek használatával végeztük. A normalitási vizsgálat eredményétől függően a paraméterek közti különbséget Student T-teszt illetve a Mann-Whitney U-teszt segítségével ellenőriztük. A változók közti korrelációk vizsgálatára a Spearman-féle korrelációs koefficiens értékét határoztuk meg. A diagramokon és a táblázatban az adatokat átlag  $\pm$  SEM értékben ábrázoltuk.

## 4. Eredmények

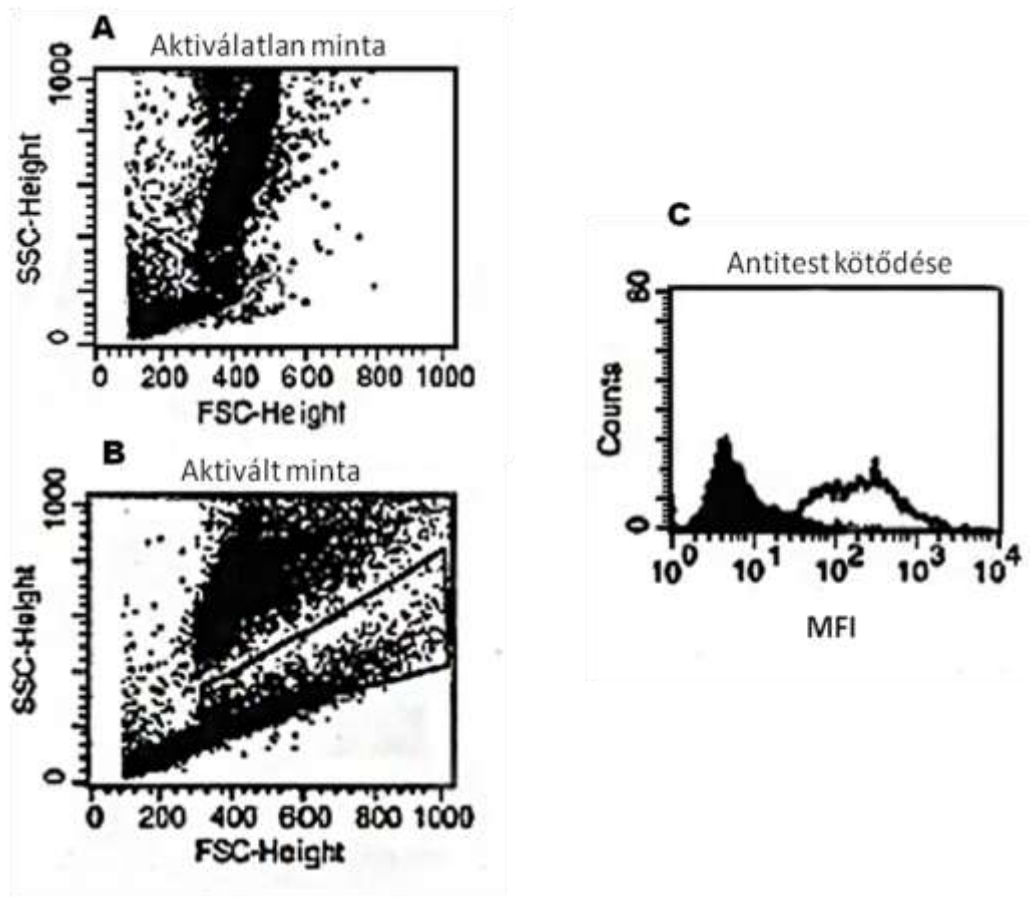
### ***4.1 Phage-display, aktivációs-specifikus antitestek tesztelése***

Az antitestfejlesztés során a Phage-display módszerével, a 3. fejezetben leírt módon fejlesztett, *E. coli* baktériumtörzs segítségével termeltetett, majd izolált, specifikusan az aktivált Mac-1-hez kötődő antitestet teszteltük.

Az alkalmazott tisztítási eljárással az antitest nehezen volt tisztítható, sok járulékos elem maradt az oldatban, amelyet a nem sikerült kiküszöbölni, ezért a felhasználás során csak a Mac-1 receptor működésének *in vitro* jellemzése jöhetett szóba. A továbbiakban ezért azt vizsgáltuk, hogy humán vérből származó monocitákon az antitest hogyan jellemzi a Mac-1 integrin aktivitásának változását.

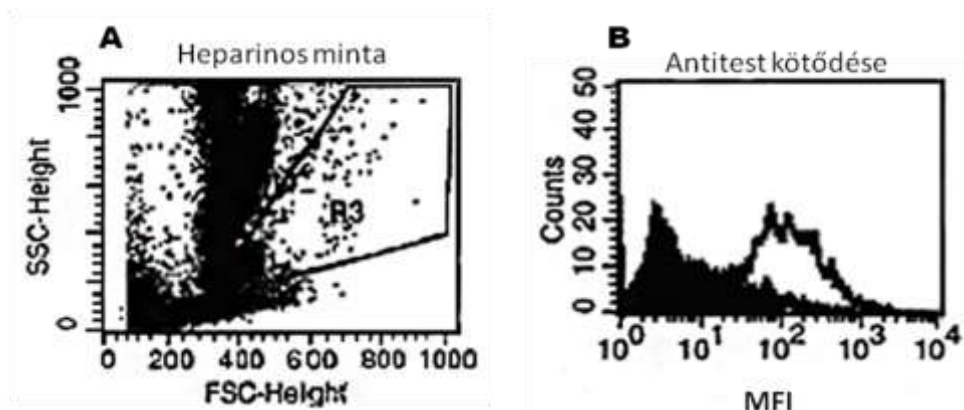
#### ***4.1.1 Az antitest működésének tesztelése monocitákon***

Elsőként teljes vérben vizsgáltuk az aktivációs-specifikus antitest kötődését áramlási citometriával. Ennek során nem tapasztaltunk szignifikáns mértékű kötődést. A méréseket stimulációt követően is elvégeztük: az antitest szignifikánsan nagyobb mennyiségben kötődött a PMA-val aktivált monocitákhoz a használt (1-10 µg/ml) koncentrációtartományban. A kötődés gátolható volt a Mac-1 integrin gátló anti-CD11b antitesttel, igazolva az antitest specificitását. A méréssorozat segítségével meghatároztuk az antitest ideális koncentrációját. Az aktivációs-specifikus antitest kötődését az aktivált és aktiválatlan monocitákhoz, illetve a kötődés gátolhatóságát a Mac-1 specifikus anti-CD11b antitesttel a 4.1.1.1 ábra szemlélteti.



4.1.1.1 ábra: a Mac-1 aktivációs specifikus antitest kipróbálása humán monocitákon teljes vérben, citrátos mintán, flow citometriás mérés. A: aktiválatlan minta, dot plot, B: aktivált minta, dot plot, C: az antitest kötődése az aktiválatlan és aktivált CD14 pozitív sejtekhez, hisztogram. Egészséges önkéntesek vérért citrátos csőbe gyűjtöttük, PMA-val aktiváltuk és megfestettük a Mac-1 aktivációs specifikus antitesttel. Az aktivált monociták szignifikánsan nagyobb mértékben kötötték az antitestet (világos hisztogram), mint az aktiválatlan monociták (sötét hisztogram). A monocitákat CD14 pozitivitásuk alapján azonosítottuk, 3000 eseményt számoltunk.

Az antitest működését tesztelését különböző véralvadásgátlók használatával, heparinos és citrátos mintában is elvégeztük (4.1.1.2 ábra). Mivel az EDTA megköti a Mac-1 működéséhez szükséges két vegyértékű kationokat, ezt a véralvadásgátlót a továbbiakban nem használtuk.



4.1.1.2 ábra: Mac-1 aktivációs-specifikus antitest tesztelése teljes vérben, heparinos mintában, flow citometriás mérés. A: aktiválatlan minta, dot plot, a CD14 pozitív sejteket jelző kapuzással, B: az antitest kötődése az aktiválatlan és aktivált CD14 pozitív sejtekhez, hisztogram. Heparinos mintában, PMA-val történő aktiváció után a mintákat a Mac-1 aktivációs-specifikus antitesttel festettük. Az aktivált monociták szignifikánsan nagyobb mértékben kötötték az antitestet (világos hisztogram), mint az aktiválatlan monociták (sötét hisztogram). A monocitákat CD14 pozitivitásuk alapján azonosítottuk, 3000 eseményt számoltunk.

A kapott eredmények alapján az antitestre vonatkozóan a következő megállapításokra jutottunk:

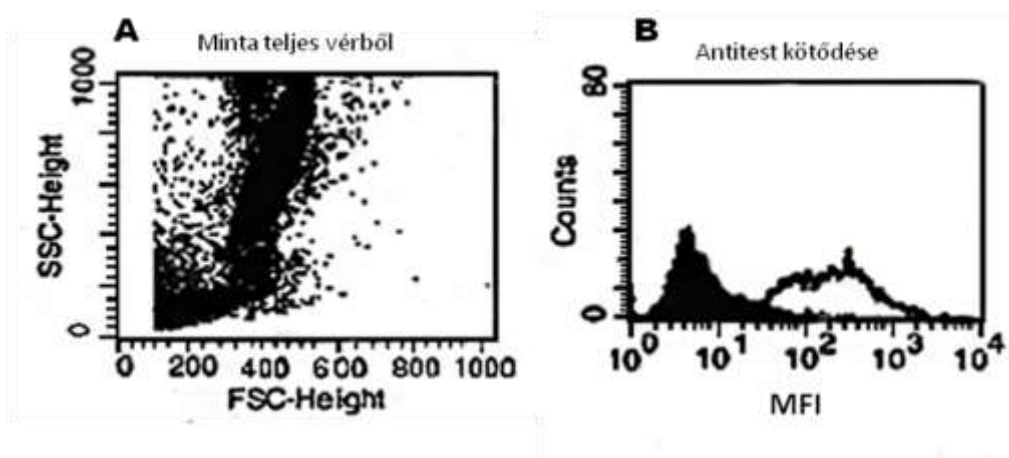
1. A kifejlesztett antitest jól kötődik a PMA-val aktivált monocitákhoz, a nem aktivált mintához azonban nem.
2. Az antitest kötődése specifikus, mivel a Mac-1 ligandkötését specifikusan gátló, anti-CD11b antitesttel blokkolható.
3. Az antitest nehezen izolálható, a tisztítási folyamat során sok melléktermék marad az oldatban, amely miatt csak in vitro felhasználás jön szóba.

#### 4.1.2 A monocita Mac-1 receptor vizsgálata az aktivációspecifikus antitesttel

A monociták izolálása során használt módszerek a monocita adhéziós receptorok aktivációjához, és monocita-trombocita aggregátumok kialakulásához vezethetnek. Mikroszkópos vizsgálataink megerősítették, hogy a hagyományos módszerrel tisztított monociták a tisztítás eredményeként komplexet képeznek a trombocitákkal. A létrehozott antitest segítségével igyekeztünk azonosítani az izolálási folyamat hatását a Mac-1 receptorra, illetve felderíteni a monocita adhéziós integrin aktivációját befolyásoló lépéseket.

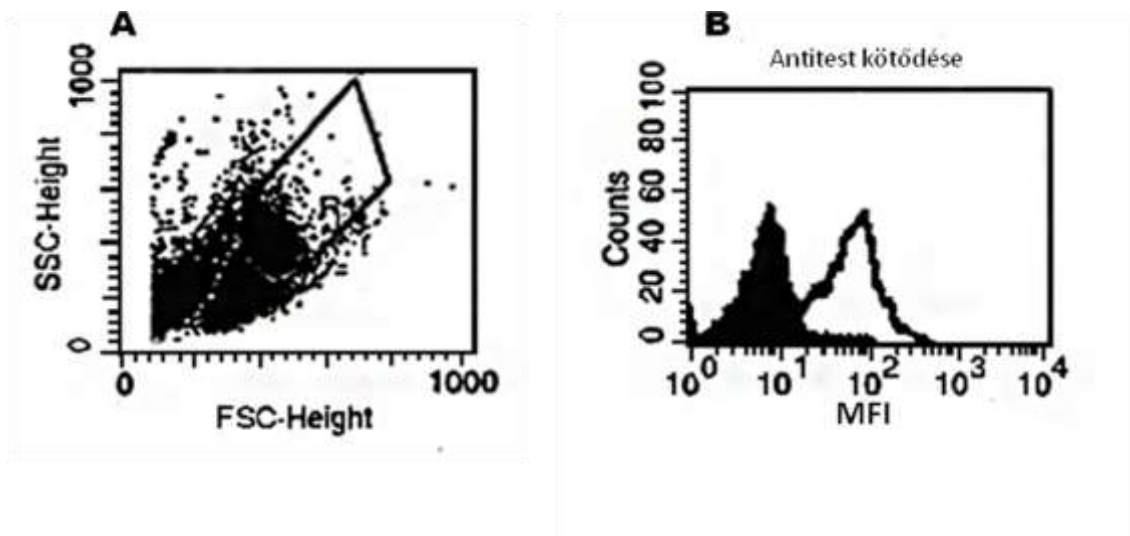
A monocitaizolálást, illetve a monocita Mac-1 aktiválódásának ellenőrzését az alább felsorolt lépésekben végeztük:

##### 1. lépés: Az antitest kötődésének vizsgálata teljes vérben



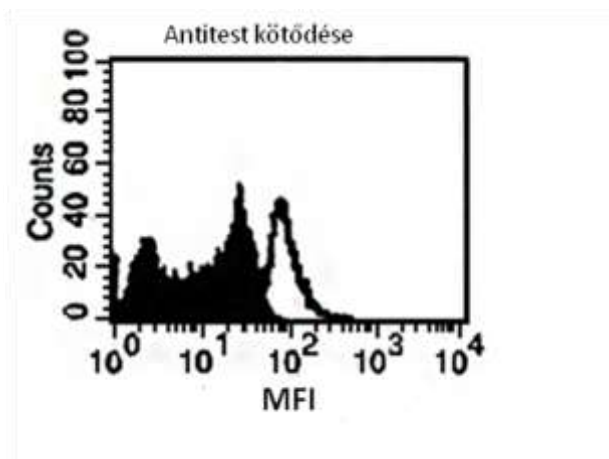
4.1.2.1 ábra: Flow citometriás analízis. Teljes vérben, citrátos mintában vizsgáltuk a monociták antitestkötését. Aktiválatlan mintához nem kötődik az antitest (sötét hisztogram), PMA-val aktivált mintában szignifikáns mértékű kötődés látható (világos hisztogram). A monocitákat CD14 pozitivitásuk alapján azonosítottuk, 3000 eseményt számoltunk.

2. lépés: Az antitest kötődésének vizsgálata Ficoll-al történő centrifugálást követően



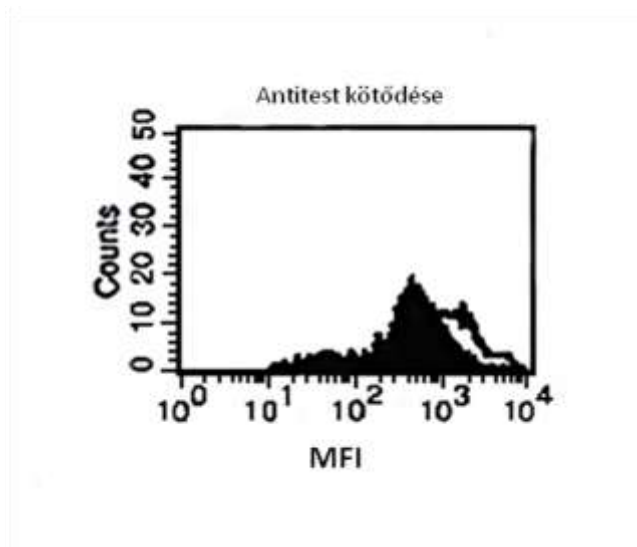
4.1.2.2 ábra: Flow citometriás analízis. Ficoll-lal történő centrifugálás után az aktiválatlan mintához nem kötődik az aktivációspecifikus antitest (sötét hisztogram). PMA-val való aktivációt követően szignifikáns mértékű kötődés látható a monocitákon (világos hisztogram). A monocitákat CD14 pozitivitásuk alapján azonosítottuk, 3000 eseményt számoltunk.

3. lépés: Mosás PBS-el, centrifugálás



4.1.2.3 ábra: Flow citometriás analízis. PBS-el történő újabb mosást és centrifugálást követően az aktiválatlan mintában is megfigyelhető kis mértékű kötődés. PMA-val történő stimulációt követően szignifikánsan nagyobb mértékű kötődés tapasztalható a monocitákon. A monocitákat CD14 pozitivitásuk alapján azonosítottuk, 3000 eseményt számoltunk.

## 4. lépés: adhézió



4.1.2.4 ábra: Sejtkultúrában 45 perc adhéziót követően a sejteket vizsgálva úgy láttuk, hogy a monociták Mac-1 adhéziós integrinje már aktivált állapotban van, mivel az aktivációspecifikus antitest ugyanúgy kötődik az aktivált (világos hisztogram), mint a nem aktivált mintához (sötét hisztogram). A monocitákat CD14 pozitivitásuk alapján azonosítottuk, 3000 eseményt számoltunk.

Az izolációs folyamat során lépésről lépésre vizsgáltuk az antitest monocita Mac-1 integrinhez való kötődését. A vérvételt követően (4.1.2.1 ábra), és Ficoll-al történő izoláció után (4.1.2.2 ábra) nem tapasztaltunk kötődést az aktiválatlan mintában. Ismételt mosás és centrifugálás után kismértékű kötődés volt megfigyelhető az aktivált mintában, ami a monocita Mac-1 integrin egy részének aktivációját jelzi (4.1.2.3 ábra). Sejtkultúra edényben (műanyag felületen) történő adhéziót követően a monociták Mac-1 integrinje aktivált állapotban van, ekkor nem látható szignifikáns eltérés a stimulált és stimulálatlan minta antitest kötése között (4.1.2.4 ábra). Mikroszkópos kontrollal megerősítettük, hogy az izolációs folyamat során műanyag edényben a monociták kötődnek a műanyag felszínhez. A monocitákhoz kötődve trombociták is láthatók voltak.

A fentiek alapján megállapítottuk, hogy a tisztítási folyamat hatással van a monocita Mac-1 integrin aktivitására.

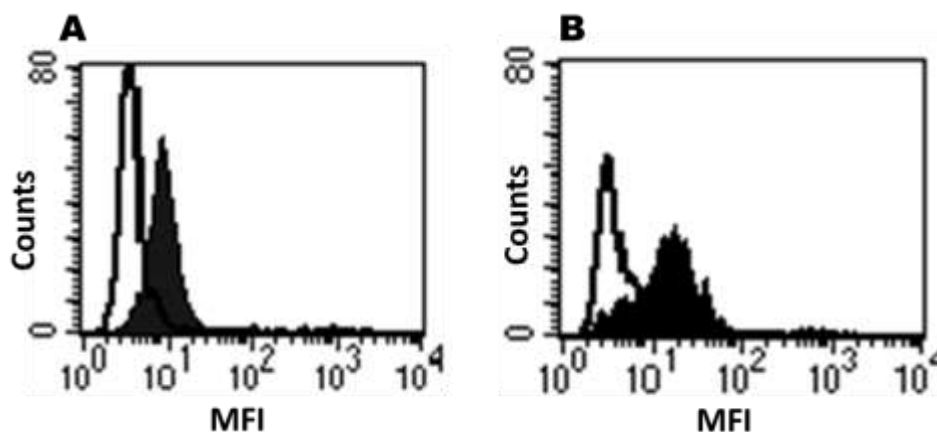
A Mac-1 további vizsgálata szempontjából rendkívül fontos, hogy az integrin aktivált illetve aktiválatlan formáját vizsgáljuk, illetve hogy ismerjük a monociták aktiváltságát és aktiválhatóságát a mérések során. Mivel a monociták már a tisztítási folyamat során részben aktiválódnak, ezért méréseinkben a továbbiakban Ficoll-centrifugálással izolált monocitákkal dolgoztunk, melyeket PE jelölt CD14 antitesttel azonosítottunk.

## 4.2 A CD40L a Mac-1 integrin ligandja

A CD40 ligand kötődését a Mac-1 receptorhoz statikus adhéziós kísérletekkel és áramlási citométerrel vizsgáltuk.

### *Flow citometriás mérések*

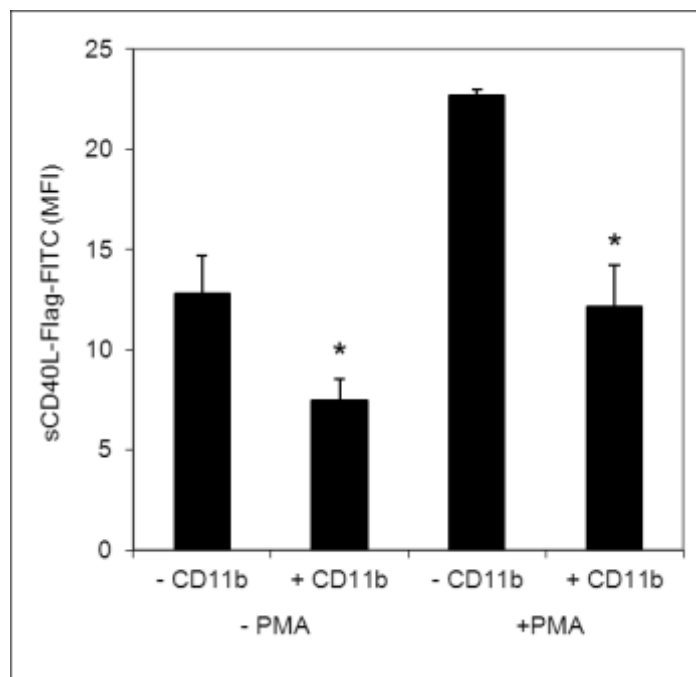
A CD40 ligand kötődését flow citométerrel is megvizsgáltuk. Ehhez jelölt rekombináns, humán szolubilis CD40 ligandot (rhsCD40L) használtunk, amelynek tisztított monocitákhoz való kötődése szintén gátolható volt az anti-CD11b antitesttel. PMA-val stimulált monociták szignifikánsan nagyobb mértékben kötötték meg a CD40 ligandot, mint a nyugalmi állapotban vizsgált monociták (4.2.1 ábra).



4.2.1 ábra: Flow citometriás mérés. A rhsCD40L kötődése monocita Mac-1 receptorhoz. A: sCD40L kötődése nyugvó monocitákon (sötét hisztogram), és a kötődés gátlása anti-CD11b gátló antitesttel (világos hisztogram), B: sCD40L kötődése PMA-val aktivált monocitákhoz (sötét hisztogram) és a kötődés gátlása anti-CD11b gátló antitesttel (világos hisztogram)



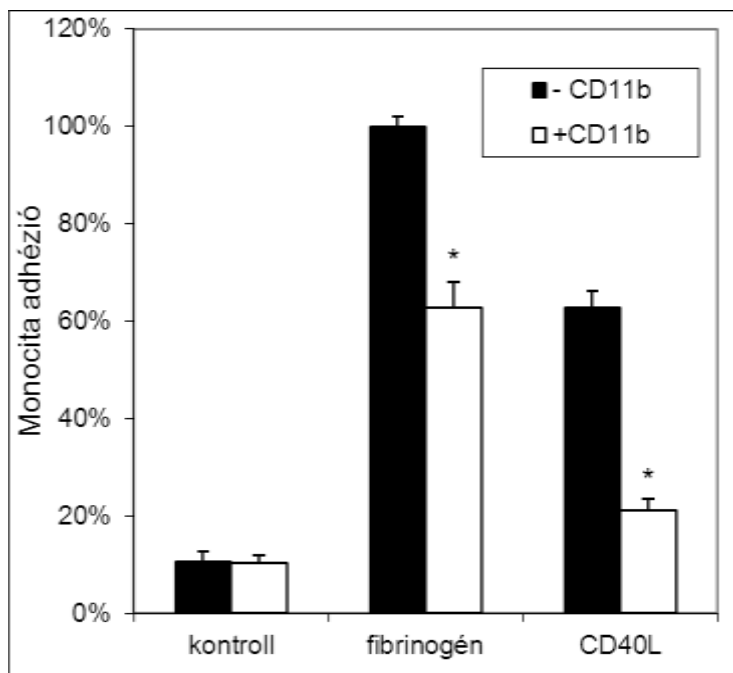
A 4.2.1 ábra szerinti flow citométeres mérések adatait a 4.2.2 ábrán látható diagram szemlélteti.



4.2.2 ábra: a CD40L kötődésének vizsgálata flow citométerrel: CD40L kötődése nyugvó és PMA-val stimulált monocitákon (-CD11b), illetve a Mac-1 gátló anti-CD11b antitest hatása az adhézióra (+CD11b). \* $p < 0,05$  a CD11b-vel nem kezelt sejtekhez viszonyítva.

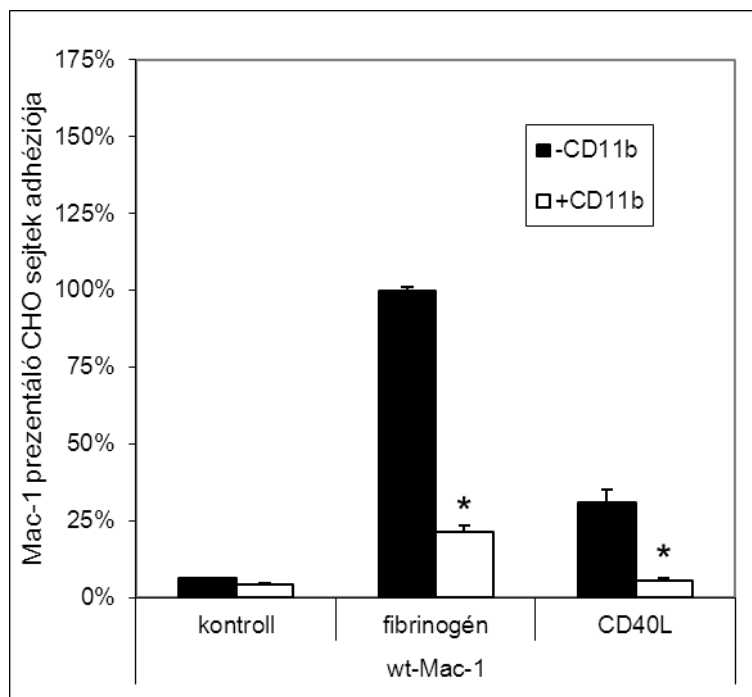
#### *Adhéziós kísérletek*

Immobilizált rekombináns humán CD40 liganddal bevont felületen vizsgáltuk humán vérből tisztított monociták adhézióját. A monociták kötődtek a CD40 liganddal bevont felülethez, a kötődés Mac-1 gátló anti-CD11b-vel szignifikáns mértékben gátolható volt. A monociták CD40 ligandon és fibrinogénen való adhézióját a 4.2.3 ábra szemlélteti.

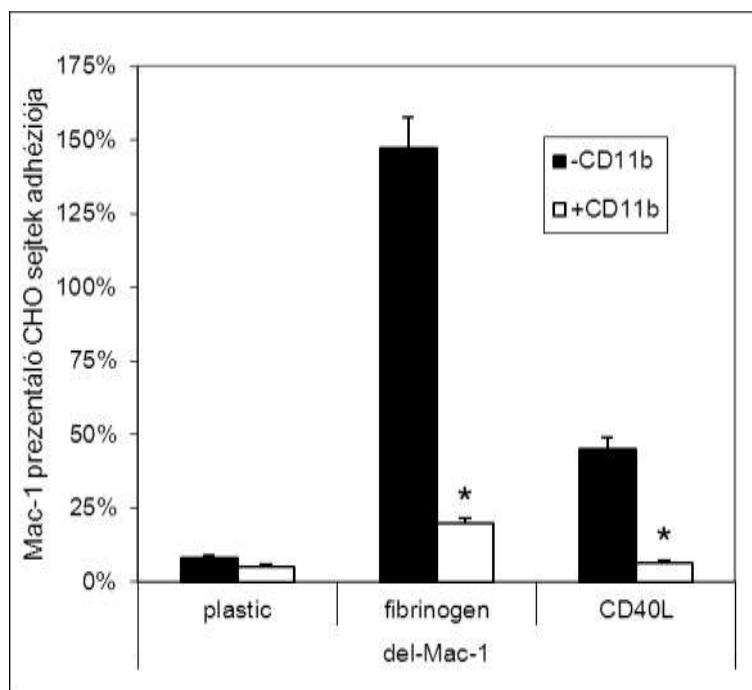


4.2.3 ábra: monocita adhézio immobilizált fibrinogénon és CD40 ligandon (-CD11b), és blokkolás anti-CD11b gátló antitesttel (+CD11b). A monociták szignifikáns mértékben kötődnek a CD40 ligandhoz. \* $p < 0,01$  a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. Pozitív kontrollként fibrinogént, negatív kontrollként agarózzal bevont műanyag felületet használtunk.

A mérést megismételtük Mac-1 prezentáló CHO sejtekkel is. Az integrint konstitutívan aktivált állapotban expresszáló (CHO del) sejtek nagyobb mértékben kötődtek a CD40 ligandhoz, mint az integrint konstitutívan aktiválatlan formában prezentáló (CHO wt) sejtek. Az adhézio mindkét esetben gátolható volt a Mac-1 specifikus anti-CD11b antitesttel. Pozitív kontrollként mindkét mérésorozatban a Mac-1 ismert ligandját, a fibrinogént használtunk, negatív kontrollként agarózzal bevont műanyag felületet szolgált (4.2.4 és 4.2.5 ábra).

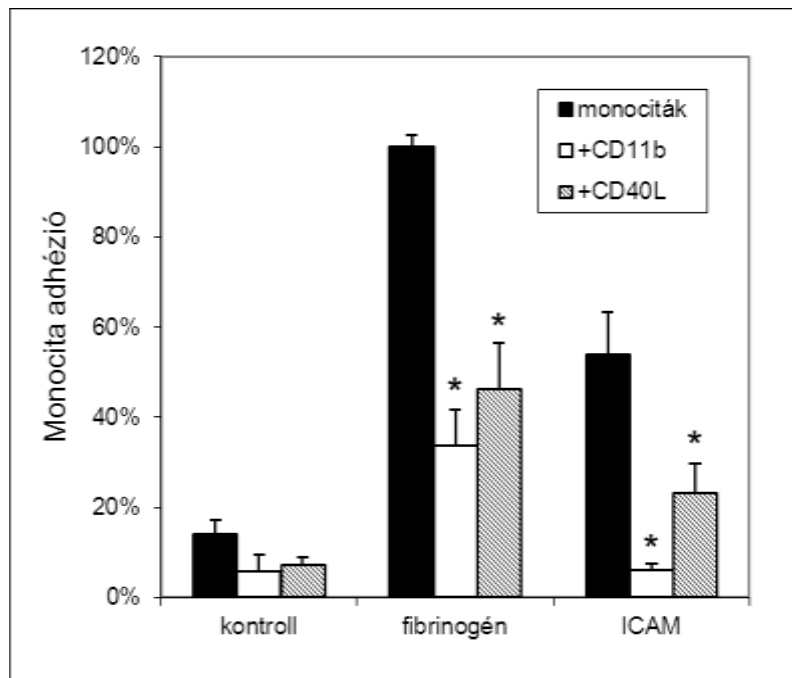


4.2.4 ábra: A Mac-1 integrint konstitutívan aktiválatlan formában prezentáló CHO wt sejtek adhéziója immobilizált rhsCD40 ligandon, és a kötődés gátolhatósága anti-CD11b gátló antitesttel, normalizált értékek. Pozitív kontrollként fibrinogént, negatív kontrollként agarózzal bevont műanyag felület szolgált. \* $p < 0,01$  az anti-CD11b gátló antitesttel nem kezelt sejtekhez viszonyítva.



4.2.5 ábra: A Mac-1 integrint konstitutívan aktivált formában prezentáló CHO del sejtek adhéziója immobilizált rhsCD40 ligandon, és a kötődés gátolhatósága anti-CD11b gátló antitesttel, normalizált értékek. Pozitív kontrollként fibrinogént, negatív kontrollként agarózzal bevont műanyag felületet használtunk. \* $p < 0,01$  az anti-CD11b gátló antitesttel nem kezelt sejtekhez viszonyítva.

A felállított hipotézis megerősítésére megvizsgáltuk, hogy a CD40 ligand a már ismert ligandokkal azonos kötőhelyre kötődik-e, illetve képes-e lefedni a Mac-1-en a már ismert kötőhelyeket. Kontrollként a Mac-1 specifikus anti-CD11b-t használtunk (4.2.6 ábra).



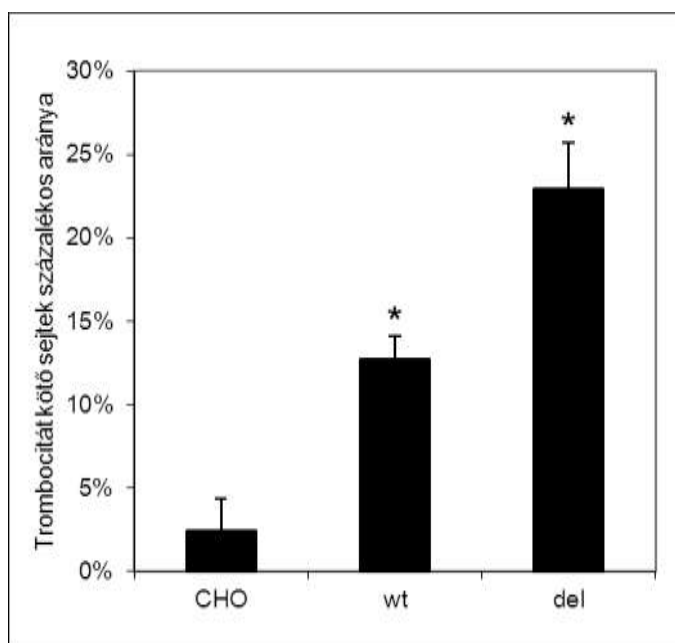
4.2.6 ábra: a CD40L kompetíciója a Mac-1 már ismert ligandjaival: monociták kötődése immobilizált fibrinogénhez és ICAM-1-hez anti-CD11b antitesttel (+CD11b) és szolubilis CD40 liganddal (CD40L) történő előkezelés után. \* $p < 0,05$  a kezeletlen sejtekhez viszonyítva.

CD40 liganddal kezelt monociták adhéziója szignifikánsan alacsonyabb volt fibrinogénen és ICAM-on, mint a kezeletlen sejteké.

### ***4.3 a Mac-1 szerepe a heteroaggregátumok kialakításában, GpIIb/IIIa és hídmolekulák jelentősége***

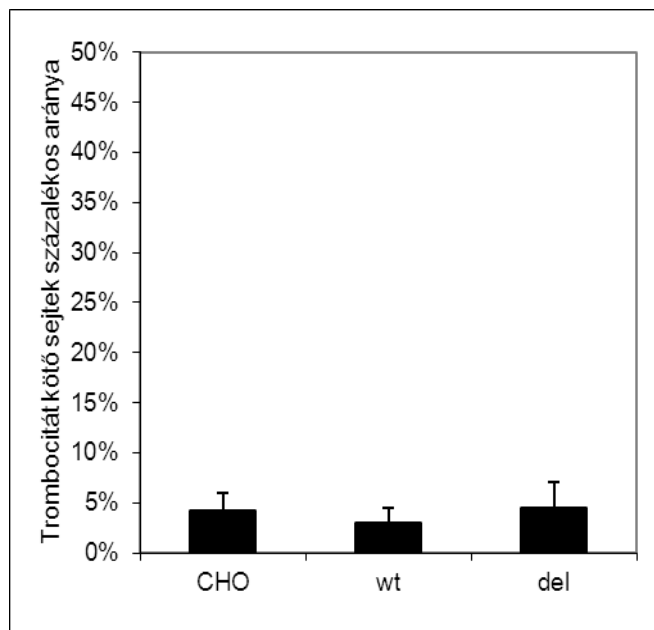
A Mac-1 komplexképzésben betöltött szerepét Mac-1 prezentáló CHO sejtekkel vizsgáltuk.

A sejt kultúrához humán vérből izolált trombocitadús plazmát (PRP, platelet rich plasma) adva a trombociták jelentős mértékben kötődtek a Mac-1 integrint prezentáló sejtekhez. Ez a kötődés az aktivált integrin jelenlétekor szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint az aktiválatlan integrin esetében (4.3.1 ábra).



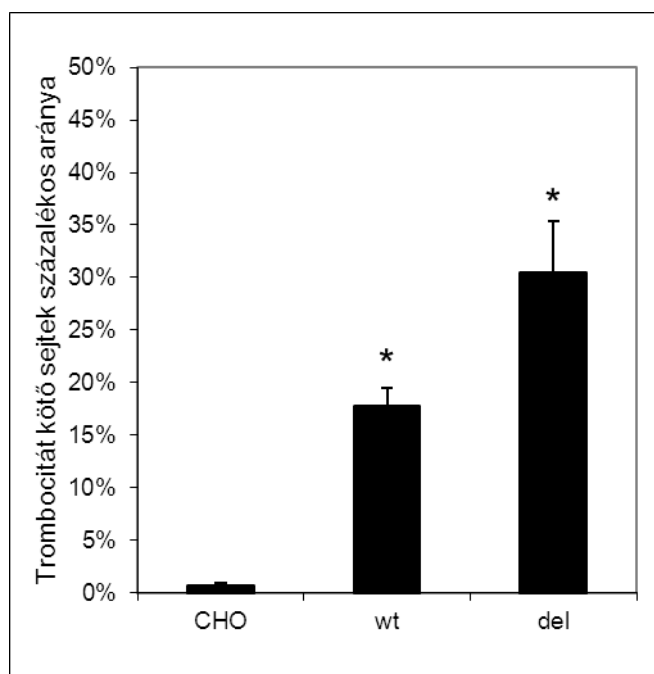
4.3.1 ábra: Trombociták kötődése PRP-ben Mac-1 prezentáló CHO sejtekhez, aktivált (del), aktiválatlan (wt) integrin esetében és az integrint nem hordozó (CHO) sejtekkel. Flow citometriás analízis. \* $p < 0,05$  a Mac-1-et nem prezentáló sejtekhez viszonyítva.

Izolált trombocitákkal megismételve a méréseket azt találtuk, hogy a trombociták nem kötődnek a Mac-1 prezentáló CHO sejtekhez (4.3.2 ábra).



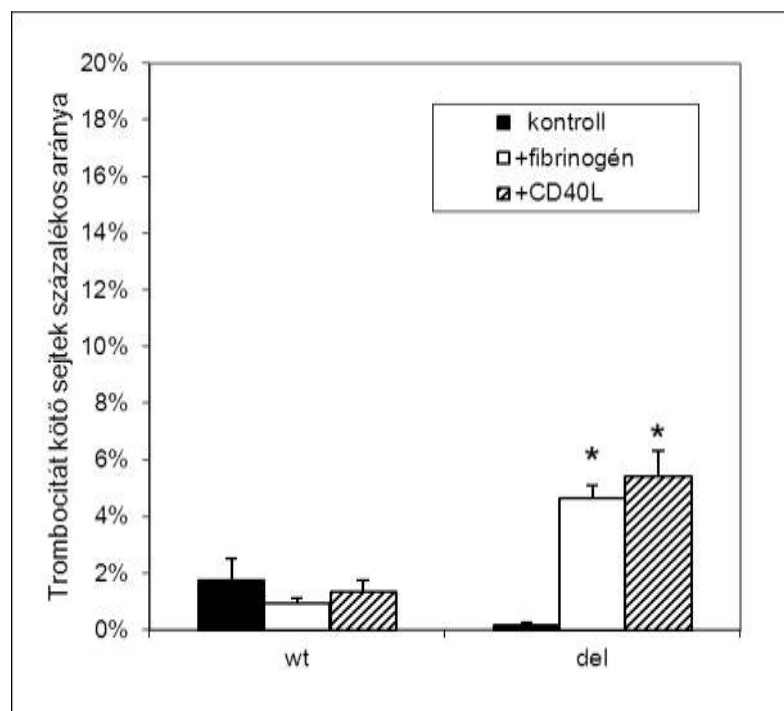
4.3.2 ábra: tisztított trombociták kötődése Mac-1 prezentáló CHO sejtekhez, aktivált (del), aktiválatlan (wt) integrin esetében és az integrint nem hordozó (CHO) sejtekkel. Flow citometriás mérés.  $p > 0,1$

Tisztított aktivált trombociták hozzáadásakor jelentős komplexképződés volt megfigyelhető (4.3.3 ábra).



4.3.3 ábra: aktivált trombociták kötődése aktivált (del), aktiválatlan (wt) integrin esetében és az integrint nem hordozó (CHO) sejtekkel. Flow citometriás mérés.  $*p < 0,05$  a Mac-1-et nem prezentáló sejtekhez viszonyítva.

A fenti eredményeket elemezve arra a következtetésre jutottunk, hogy a trombociták kötődéséhez szükség van olyan közvetítő molekulákra, melyek a Mac-1-nek ligandjai és a vérplazmában jelen vannak, vagy a vérlemezkékből szabadulnak fel aktiváció hatására. A feltevés igazolására a fibrinogént és a CD40 ligandot vizsgáltuk, melyek a Mac-1-nek ligandjai és trombocitákból felszabadulhatnak aktiváció hatására.

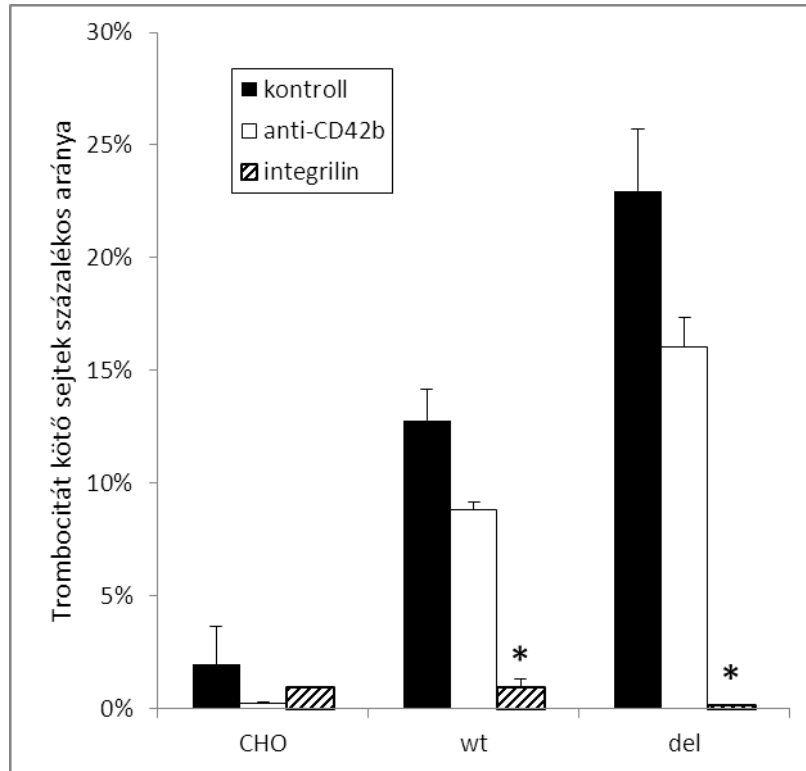


4.3.4 ábra: fibrinogén és CD40L hatása az aggregátumképződésre aktivált (del), aktiválatlan (wt) integrin esetében és az integrint nem hordozó (CHO) sejtekkel. Flow citometriás mérés. \* $p < 0,05$  a megfelelő kontrollhoz viszonyítva.

Szolubilis CD40 ligand vagy fibrinogén hozzáadásakor kis mértékben, de szignifikánsan megemelkedett a komplexképződés mértéke (4.3.4 ábra).

A következőkben gátló antitesttel kerestük a trombocitákon a komplexképződésért felelős molekulát/molekulákat. Az irodalomban számos adat utal arra, hogy akut kardiovaszkuláris állapotokban, GpIIb/IIIa gátló antitestekkel (eptifibatid, abciximab)

jelentős mértékben csökkenthető a keringő leukocita-trombocita aggregátumok mennyisége.



4.3.5 ábra: A sejt-trombocita aggregátumképződés gátlására irányuló kísérletek, anti-CD42b-vel és GpIIbIIIa gátló integrilinnel. Flow citometriás mérés. \* $p < 0,05$  a megfelelő kontrollhoz képest.

A GpIIb/IIIa gátló integrilin (eptifibatid) segítségével teljes mértékben sikerült megakadályozni a komplexek képződését. A vizsgált másik antitest, az anti-CD42b kisebb, nem szignifikáns mértékben csökkentette a kialakuló aggregátumok mennyiségét (4.3.5 ábra).



#### 4.4 a Mac-1 viselkedése II típusú diabéteszes betegekben

A módszerek részben leírt beválasztási kritériumoknak megfelelő betegek laborértékeit és az összehasonlításukra használt statisztikai teszteket a 4.4.1 táblázat szemlélteti.

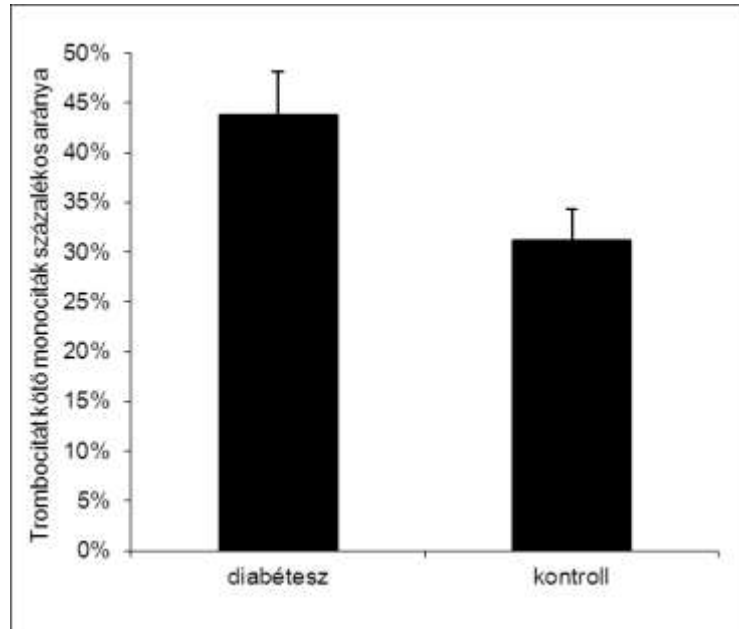
A laborértékek vizsgálatokor a vércukorértékek kivételével nem volt kimutatható szignifikáns eltérés a diabéteszes és a kontrollcsoport paraméterei között. A gyulladásos paraméterek, mint a sülyedés, fehérvérsejtszám, CRP és IL-6 szintén nem különböztek a két csoport között.

|   | <b>diabétesz</b> | <b>kontroll</b> | <b>p érték</b> | <b>statisztikai teszt</b> |
|---|------------------|-----------------|----------------|---------------------------|
| <b>Életkor</b>                                | 52.31 +/- 3.14   | 43 +/- 4.14     | 0.09           | t-test                    |
| <b>Vércukor (mmol/l)</b>                      | 8.66 +/- 1.21    | 4.99 +/- 0.21   | 0.01           | Mann-Whitney              |
| <b>HbA1c (%)</b>                              | 8.9 +/- 0.65     |                 |                |                           |
| <b>Összkoleszterin (mmol/l)</b>               | 5.23 +/- 0.33    | 5.08 +/- 0.31   | 0.74           | t-test                    |
| <b>HDL (mmol/l)</b>                           | 1.4 +/- 0.16     | 1.37 +/- 0.2    | 0.9            | t-test                    |
| <b>LDL (mmol/l)</b>                           | 3.15 +/- 0.44    | 3.04 +/- 0.39   | 0.85           | t-test                    |
| <b>Triglicerid (mmol/l)</b>                   | 2.23 +/- 0.46    | 1.37 +/- 0.18   | 0.17           | Mann-Whitney              |
| <b>Fehérvérsejtszám (G/l)</b>                 | 6.71 +/- 0.41    | 6.43 +/- 0.5    | 0.71           | t-test                    |
| <b>Monocita (G/l)</b>                         | 0.33 +/- 0.01    | 0.38 +/- 0.03   | 0.1            | t-test                    |
| <b>Trombocita (G/l)</b>                       | 251.35 +/- 12.38 | 258.63 +/- 20.2 | 0.75           | t-test                    |
| <b>CRP (mg/l)</b>                             | 3.78 +/- 1.02    | 2.57 +/- 0.94   | 0.59           | Mann-Whitney              |
| <b>Sülyedés (mm/h)</b>                        | 15.83 +/- 1.9    | 9 +/- 3.35      | 0.08           | t-test                    |
| <b>IL-6 (pg/ml)</b>                           | 15.9 +/- 1.92    | 16.95 +/- 0.52  | 0.71           | t-test                    |
| <b>sCD40L (ng/ml)</b>                         | 1.21 +/- 0.14    | 1.19 +/- 0.2    | 0.97           | t-test                    |
| <b>Mac-1 (MFI)</b>                            | 226.73 +/- 47    | 206.89 +/- 32.8 | 0.73           | t-test                    |
| <b>monocita-trombocita aggregátumok száma</b> | 43.8% +/- 4.3%   | 31.2% +/- 3.11% | 0.027          | t-test                    |

4.4.1 táblázat: laborparaméterek a II típusú diabéteszes és kontroll csoportban

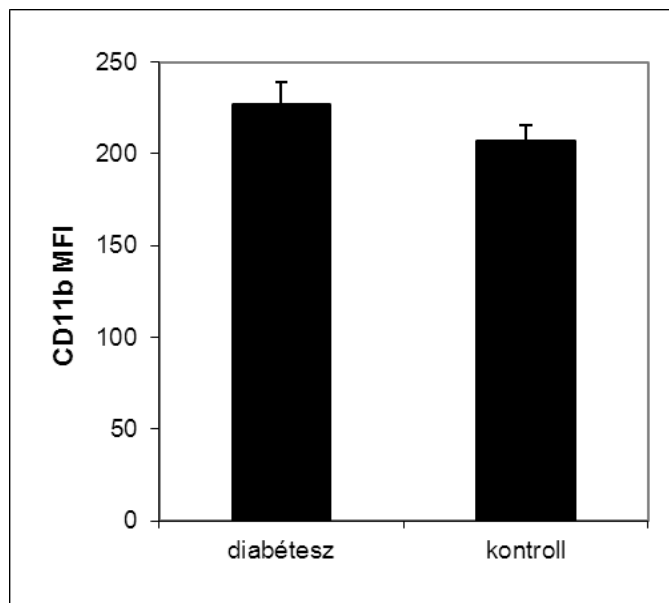
A monocita-trombocita aggregátumok száma szignifikánsan magasabb volt a diabéteszes, mint a kontroll csoportban ( $p < 0,05$ , 4.4.1 ábra). A komplexek mennyisége pozitív korrelációt mutatott a vércukorszinttel és a trigliceridszinttel, de nem mutatott

összefüggést az összkoleszterinnel, a HDL és az LDL koleszterinnel, sem pedig a CD40 ligand mennyiségével, a gyulladásos paraméterekkel, vagy a többi laborértékkel.



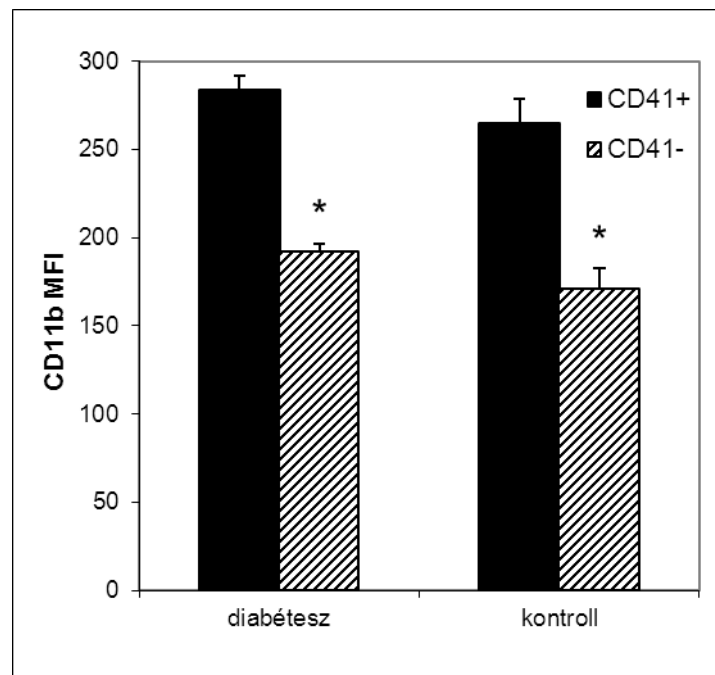
4.4.1 ábra: Monocita-trombocita aggregátumok százalékos aránya diabéteszes és kontroll csoportban. Flow citometriás mérés,  $p=0,027$ .

A monociták Mac-1 expressziója nem különbözött jelentősen a diabéteszes és a kontroll csoportban ( $p=0,73$ ), és nem mutatott összefüggést a laborparaméterekkel sem (4.4.2 ábra).



4.4.2 ábra: monociták Mac-1 integrin expressziója (CD11b fluoreszcencia intenzitás) diabéteszes és kontroll csoportban. Flow citometriás mérés,  $p=0,73$ .

Jelentős különbség mutatkozott ugyanakkor a monocita-trombocita komplexet alkotó és a komplexen kívüli monociták között. A monociták vizsgálatakor szignifikánsan magasabb CD11b expresszió volt látható azokon a sejteken, amelyek trombocitákat kötöttek ( $p=0,005$ ). Ez a különbség a diabéteszes és a kontroll vizsgálati csoport monocitáin megfigyelhető volt, még hozzá azonos mértékben (4.4.3 ábra).



4.4.3 ábra: Mac-1 integrin expressziója diabéteszben és kontroll csoportban, trombocitákkal komplexet alkotó (CD41+) és komplexen kívüli monocitákon (CD41-). Flow citometriás mérés. \* $p=0,005$  a komplexet alkotó monocitákhoz viszonyítva.

## 5. Megbeszélés

### **A CD40 ligand a Mac-1 integrin új ligandja**

A CD40 ligand egy sokszínű molekula, melynek jelentős szerepet tulajdonítanak az érlemezésedés pathogenezésében [99,101-103]. Az érlemezésedéses plakk számos sejtjén megtalálható, mint pl. az endothel, simaizomsejt, makrofág [101,105]. Nagy mennyiségben jelenik meg a trombocitákon is, aktivációt követően. Freiburgi munkacsoportunk állatkísérletes modelljében a CD40 ligandnak egy a saját receptorától független funkcióját írta le Vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a CD40 ligand kötődik a Mac-1 adhézis integrinhez. Ez a kapcsolódás stabil adhézist hoz létre CD40 liganddal bevont felületen és az integrin I doménjéhez kötődő, specifikus gátlószerezrel blokkolható. A CD40 ligand szolubilis formában is kötődik a Mac-1 integrinhez, és verseng az integrin ismert ligandjaival a kötőhelyért. Mivel a CD40 ligand mind az endothelen, mind pedig az aktivált trombocitákon jelen van, a Mac-1-CD40 ligand interakciónak jelentősége lehet a monociták érfalon keresztül történő migrációjában a sérült illetve atherosclerotikus érszakaszokon.

### **A Mac-1 integrin önállóan is képes a trombocitákkal komplexet létrehozni.**

A leukocita-trombocita aggregátumokkal kapcsolatos első megfigyelések mintegy 50 évvel ezelőtt történtek. Azóta számos vizsgálat irányult a leukociták és vérlemezkék kapcsolatára, azonban a mai napig nem teljesen tisztázottak keletkezésük okai és körülményei.

A keringő leukociták és a trombociták a különböző hatásokra aggregátumokat alkotnak, melyek változó ideig maradhatnak fenn a véráramban. A kapcsolódás első, sebességmeghatározó lépése a P-selectin-PSGL-1 kapcsolat, a P-selectin gátlásával kapcsolatos mérések azonban kimutatták, hogy nem ez az egyetlen kapcsolódási pont a vérlemezkék és a fehérvérsejtek között. 1998-ban Konstantopoulos és munkatársai igazolták, hogy a folyamatban integrinek is részt vesznek és már akkor valószínűsítették a CD11b integrin szerepét a kölcsönhatásban [145]. A későbbiekben kiderült, hogy a Mac-1 (CD11b/CD18) integrin fontos stabilizáló szerepet tölt be a heteroaggregátumok életében, enélkül az aggregátumok rövid idő alatt szétesnek [123,146].

Az integrineknek a sejtek közötti kapcsolódásban, különösen az érlelmeszesedésben betöltött szerepét több helyen leírták. Ezek a molekulák általában egy szelektineken keresztül létrejövő, kezdeti laza kapcsolatot követően egy erősebb stabil adhéziót hoznak létre, amely azután lehetővé teszi a sejtek szoros együttműködését pl. az endothelen keresztül történő migráció esetében. Az endothelt modellező, ICAM-ot prezentáló sejtekkel végzett in vitro vizsgálatokban úgy találták, hogy a sejtek leukocitákkal való interakciója szelektinek közvetítése nélkül is megvalósul [146]. Humán Mac-1 integrint prezentáló CHO sejtvonalunk segítségével elsőként írtuk le, hogy a Mac-1 integrin a szelektinek közvetítése nélkül is képes humán vérből származó trombocitákkal aggregátumokat alkotni. Az aggregátumok nagyobb számban képződnek az aktivált Mac-1 jelenlétében. A kapcsolódás specificitását a Mac-1 gátló anti-CD11b-vel igazoltuk. Negatív kontrollként szolgált emellett a Mac-1-et nem prezentáló CHO sejtvonal, mely minden más tulajdonságában a Mac-1-et prezentáló sejtekkel teljesen megegyezett. Eredményeink új megvilágításba helyezik a Mac-1 szerepét a vérlemezkék és fehérvérsejtek kapcsolatában, emellett a leukocita-trombocita komplexek kialakulásának gátlásában is jelentőséggel bírhat. A  $\beta_2$  integrineken keresztül, szelektinek nélkül létrejövő direkt adhézióknak fontos szerepe lehet a leukociták alacsony nyíróerők mellett történő érfalból való kilépésében is a nagy perfúzióval ellátott szervekben, mint a máj [149] és a tüdő [150], illetve gyulladás esetén a perifériás mikrocirkuláció területén [151].

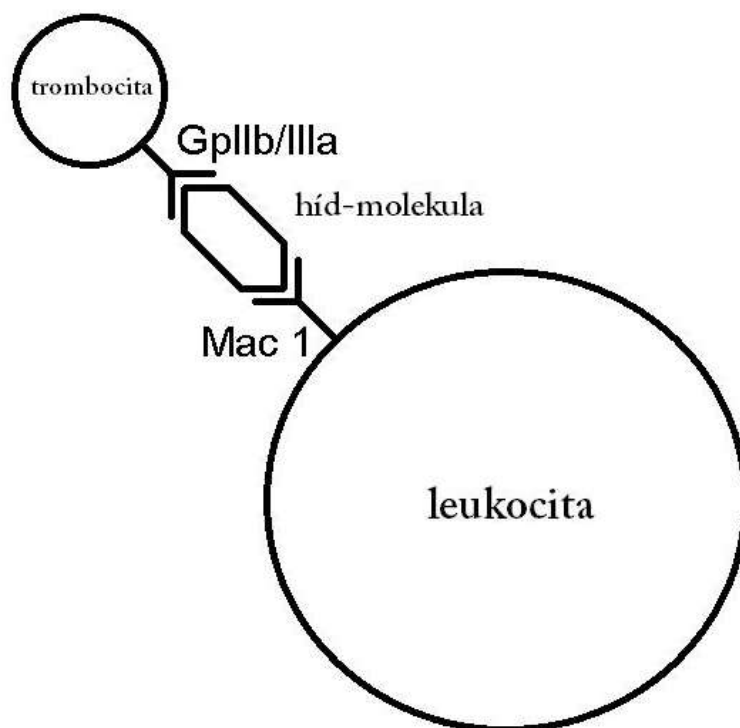
#### **A monocita-trombocita kapcsolat Mac-1-en keresztül történő stabilizációjában a GpIIb/IIIa mint a trombocitán levő partner fontos szerepet játszik**

A Mac-1-et hordozó CHO sejtvonal segítségével egyedülálló lehetőségünk nyílt a Mac-1-el való kapcsolatban résztvevő trombocita partner azonosítására. Ennek során a trombocita GpIIb/IIIa-t mint a kapcsolódáshoz szükséges trombocita partnert azonosítottuk. Vizsgálatunk összhangban van azokkal a korábbi klinikai és in vitro megfigyelésekkel, melyekben a trombocita GpIIb/IIIa-t gátló készítmények alkalmazásával egyidőben mintegy mellékleletként csökkent leukocita-trombocita aggregátumszinteket találtak [152,153]. Minthogy a monocita-trombocita aggregátumok

képződése a résztvevő sejtes elemek további aktivációjával, és a monociták fokozott kitapadásával jár, eredményeink a GpIIb/IIIa gátlóknak a meglevő alkalmazást kiegészítő, illetve új terápiás lehetőségeire világítanak rá.

**A monocita Mac-1 és a GpIIb/IIIa kapcsolódásához szükség van egy köztes „híd”-molekulára, amelynek szerepét a fibrinogén és a CD40 ligand is betöltheti.**

Vizsgálataink során úgy találtuk, hogy bár vérplazma hozzáadásakor létrejön a kapcsolódás, a Mac-1-et hordozó CHO sejtek nem kötik meg a tisztított vérlemezkéket. Ebből arra következtettünk, hogy a vérplazmában jelen van egy olyan faktor, ami a kapcsolódást lehetővé teszi (5. ábra). Hasonlóképpen, tisztított, aktivált trombociták használatakor jelentős aggregátumképződés volt megfigyelhető, ami arra enged következtetni, hogy a Mac-1-vérlemezke kapcsolódás létrejöttéhez szükséges, vérplazmában jelen levő további molekulák az aktivált trombocitákból felszabadulhatnak.



5.1 ábra: A leukocita-trombocita heteroaggregátum keletkezésében a leukociták Mac-1 integrinjén és a trombociták GpIIb/IIIa receptorán kívül szükség van egy közvetítő molekulára, amely mindkét adhéziós molekulának ligandja.

Az irodalomban talált adatok arra utalnak, hogy a trombocita-leukocita kapcsolódás létrejöttéhez szükséges a trombociták előzetes aktivációja. Rinder és munkatársai leírták a trombocita aktiváció szükségességét a neutrofil- illetve monocita-trombocita komplexek kialakulásához [154]. A szerzők a CD11b-nek nem tulajdonítottak jelentőséget, vizsgálataikhoz azonban fixált vérlemezkéket használtak. Brown és munkatársai 1998-ban kimutatták, hogy az élő vérlemezkék másképp viselkednek a heteroaggregátumok képződésekor, mint a fixált minta [123]. Elméletben már ők felvetették a trombocitákból származó szolubilis mediátorok jelentőségét a kapcsolódásban.

Az irodalmi és saját adataink alapján olyan köztes molekulát kerestünk, amely mind a Mac-1-nek, mind a GpIIb/IIIa-nak ligandja, így betöltheti a kapcsolódó adhéziós molekulák közti híd-molekula szerepét. Ebből a megfontolásból kézenfekvőnek látszott a fibrinogén, mely mindkét molekulának ligandja. Sőt, 1998-ban Brown és munkatársai, illetve 2000-ben Hentzen és munkatársai utaltak arra, hogy szerepet játszhat a leukocita-trombocita komplexek keletkezésében, bár az említett korábbi kísérletekben sem a fibrinogén szerepét, sem a kapcsolódó molekulákat nem sikerült tisztázni [123,146]. Vizsgálataink során elsőként mutattuk ki, hogy a fibrinogén jelenléte lehetővé teszi a Mac-1-vérlemezske komplexek létrejöttét.

A fibrinogén mellett vizsgálatunk tárgyának a CD40 ligandot választottuk, mely a GpIIb/IIIa-nak partnere, Mac-1-hez való kapcsolódását pedig mi írtuk le először. A CD40 ligand esetében bár kisebb mértékű, de szignifikáns heteroaggregátum-képződés volt megfigyelhető. Eredményeink alapján tehát a CD40 ligand nem csak a monociták adhéziójában, hanem a sejt-sejt interakciókban is szerepet játszik a Mac-1-hez való kötődése révén.

A trombocita-leukocita kapcsolatokban szereplő trombocita eredetű molekulák illetve trombocita mikropartikulumok lehetséges részvétele már korábban felmerült, eddig azonban nem sikerült ezek szerepét és a kapcsolódásban szereplő adhéziós molekulákat azonosítani. Ezekben az elméleti megfontolásokban a fibrinogénről úgy vélekedtek, hogy nem tölt be jelentős szerepet a kapcsolódásban. Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy mind a fibrinogén, mind a CD40 ligand betöltheti a Mac-1-GpIIb/IIIa kapcsolódáshoz szükséges hídmolekula szerepét. A kölcsönhatásban említett molekulák

mellett nagy valószínűséggel részt vehetnek más szolubilis mediátorok is, melyek a Mac-1-nek és a GpIIb/IIIa-nak ligandjai.

**II típusú diabéteszben a monocita-trombocita aggregátumok szintje a gyulladásos mediátorok megemelkedése előtt illetve attól függetlenül megemelkedik.**

A leukocita-trombocita, különösen pedig a monocita-trombocita aggregátumok szintje jelentősen megemelkedik érlelmeszesedésben illetve az érlelmeszesedéses rizikóállapotokban. Ilyen kockázati állapotnak számít a cukorbetegség, melyről kimutatták, hogy hatására változik a keringésben található sejtes elemek aktiváltsági állapota, megemelkedik a heteroaggregátumok képződése. Előrehaladott betegségben, koronária- cerebrovaszkuláris illetve vesebetegséggel szövődött diabéteszben jelentős különbségek mutatkoznak a leukocita-trombocita komplexképződést tekintve az egészséges populációhoz képest. Habár, ezekben a betegcsoportokban más szolubilis mediátorok és markerek, pl. a gyulladásos paraméterek szintje is megemelkedik, amelyet markerként is használnak a betegség progressziójának megítélésére. Minthogy a gyulladás illetve mediátorai maguk is elősegíthetik a monociták, trombociták aktivációját, további vizsgálatainkhoz olyan betegcsoportot választottunk, melyben a diabéteszes szövődmények, kardiovaszkuláris-, illetve vese-szövődmények tünetei nem voltak fellelhetőek. A CD40 ligandnak a fenti folyamatokban való részvétele és az irodalmi adatok alapján az érlelmeszesedésben betöltött fontos szerepe kapcsán felmerült a kérdés, hogy plazmaszintje összefügg-e a monocita-trombocita aggregátumok szintjével.

A vizsgált betegcsoportban szignifikánsan emelkedett monocita-trombocita aggregátumszintet találtunk, amely azonban nem mutatott összefüggést a CD40 ligand plazmaszintjével. Szignifikáns korreláció mutatkozott ugyanakkor az aggregátumszint és a triglicerid vérszintje között, és enyhe, de kimutatható összefüggést láttunk a monocita-trombocita komplexek és a vércukorszint között. A gyulladásos paramétereket tekintve nem találtunk jelentős eltérést a kontrollcsoportéhoz képest. Eredményeink alapján szövődménymentes diabéteszben a monocita-trombocita heteroaggregátumok szintjének emelkedése megelőzi a gyulladásos paraméterek megjelenését, érzékenyebben reagálva a folyamatban tapasztalható változásokra. Ezeknek a



paramétereknek a diabétesz progressziója során történő további nyomonkövetése érdekes eredményekkel szolgálhat.

**A trombocitát kötő monocitákon fokozódik a Mac-1 expressziója, melynek mértéke független a diabétesz jelenlététől.**

Előrehaladott atherosclerotikus állapotokban, kardiovaszkuláris, cerebrovaszkuláris és érrendszeri, illetve vesebetegséggel szövődött diabéteszben fokozott adhéziós receptor szinteket mértek. Vizsgálatunkban a korai, szövődményektől mentes diabéteszes betegek Mac-1 expresszióját vizsgáltuk.

Eredményeink azt mutatták, hogy diabéteszben nem emelkedik meg jelentős mértékben a Mac-1 expressziója. Az aggregátumokat vizsgálva megállapítottuk, hogy a Mac-1 expressziója jelentősen megemelkedik azokon a monocitákon, melyek trombocitát kötnek, a trombocitát nem kötő monocitákhoz viszonyítva. Ez a különbség a betegség jelenlététől függetlennek látszik, mivel mind az egészséges, mind a diabéteszes vizsgálati alanyokban megfigyelhető volt, azonos mértékben.

A monocita-trombocita aggregátumok szintjének változása nagyon érzékenyen jelzi a trombociták aktiváltsági állapotát. A predilekciós ill. atherosclerotikus területeken, de a szervezetben fennálló krónikus gyulladást fenntartó folyamatok hatására is így nagyszámú heteroaggregátum alakulhat ki, melyek a keringésben hosszabb-rövidebb ideig maradnak fenn. Az egymáshoz való kapcsolódás a komplex alkotóinak további aktivációjához vezet, proinflammatorikus és protrombotikus változásokat indít el, ami a sejtfelszíni molekulák, citokinek expressziójának emelkedésében, a komplex stabilizálódásában nyilvánulhat meg. Vizsgálataink alapján a Mac-1 – GpIIb/IIIa kapcsolatnak, vagyis a leukocita-trombocita komplex Mac-1-en keresztül történő stabilizálódásának is ez az aktiváció a feltétele, mivel a leukocita Mac-1 affinitása a kötődés hatására, aktivált formában jelentősen megnő és a trombocitából az aktiváció hatására felszabaduló mediátorok, mint a fibrinogén és a CD40 ligand jelenléte is elősegíti a kapcsolat létrejöttét. A komplexek ezután lokálisan vagy szisztémásan a keringésben maradhatnak, vagy kiléphetnek az érfalba, amely folyamatot szintén jelenősen elősegíti a trombociták kötődése – ezt igazolják azok az adatok, melyek szerint a monociták vérlemezkékkel való kapcsolata elősegíti a sérült érfalon való kitapadást és a szubendotheliális térbe való migrációt.

## 6. Következtetések

**A dolgozat fő megállapításai a következők:**

**1. A CD40 ligand kapcsolódik a leukocita Mac-1 receptorhoz és verseng a fibrinogénnel a kötőhelyekért.**

Ez a megfigyelés új kapcsolódási pontot jelent a gyulladás és érlelmeszesedés folyamatában, és a CD40 ligand egy új funkciójára hívja fel a figyelmet.

**2. A Mac-1 integrin (CD11b/CD18) részt vesz a trombociták sejtfelszínhez való kötődésében, amely interakcióhoz a P-selectin jelenléte nem feltétlenül szükséges.**

Sejtkultúrák kísérleteinkben a humán sejtfelszíni molekulák közül csak a Mac-1-et prezentáló CHO sejtek voltak képesek a trombocitákkal komplexet képezni. Eszerint a leukocita-trombocita kölcsönhatásban szereplő Mac-1 a P-selectin előzetes ligandkötése nélkül is képes megkötni a trombocitákat, ami megerősíti a Mac-1 kötődés jelentőségét a leukocita-trombocita kapcsolatokban.

**3. A Mac-1 integrin a trombocitán jelen levő GpIIb/IIIa receptoron keresztül létesít kapcsolatot a trombocitákkal.**

Azonosítottuk a Mac-1-el való kapcsolódásban résztvevő, korábban ismeretlen trombocita receptort. Ez az eredmény ugyanakkor felhívja a figyelmet a GpIIb/IIIa receptor blokkolók egy lehetséges új hatásmechanizmusára, ami megmagyarázza a korábban klinikai vizsgálatokban, GpIIb/IIIa gátló kezelés alkalmazásakor talált alacsonyabb leukocita-trombocita komplexszinteket, egyben új terápiás jelentőséget tulajdonít az említett gyógyszercsoportnak.

**4. A fibrinogén és a CD40 ligand mint hídmolekulák szerepet játszanak monocita Mac-1 és trombocita GpIIb/IIIa integrinek kapcsolódásában.**

Igazoltuk, hogy a Mac-1-GpIIb/IIIa integrinek kapcsolódásához elengedhetetlen egy hídmolekula jelenléte, amely a Mac-1-nek és a GpIIb/IIIa-nak is ligandja. Ez a megfigyelés a sejtfelszíni Mac-1 és GpIIb/IIIa integrinek közti kapcsolódás

mechanizmusát írja le, felhívja a figyelmet a leukocita és trombocita aktiváció illetve a keringésben levő szolubilis mediátorok jelentőségére a sejtközi kapcsolatokban.

**5. A monocita-trombocita aggregátumok mennyiségének emelkedése megelőzi a gyulladásos paraméterek megjelenését 2 típusú diabéteszben.**

Igazoltuk, hogy szövődménymentes 2 típusú diabéteszes betegekben szignifikánsan megemelkedik a monocita-trombocita aggregátumok szintje, a gyulladást jelző laborértékek ugyanakkor nem jeleznek elváltozást. Eszerint a megfigyelés szerint a monocita-trombocita aggregátumok szintjének emelkedése érzékenyebben jelzi a diabéteszben zajló változásokat, mint a szövődményes állapotokban emelkedettnek talált gyulladásos paraméterek, pl. a CRP vagy az IL-6.

**6. A trombocitát kötő monocitákon fokozott Mac-1 expresszió észlelhető, ami független a 2 típusú diabétesz jelenlététől.**

Igazoltuk, hogy azokon a monocitákon, amelyek a trombocitákkal aggregátumot alkotnak, fokozódik a Mac-1 adhézións integrin expressziója. Ez az emelkedés a diabéteszes és az egészséges populációban egyaránt megtalálható, mértéke a két vizsgált csoportban azonos, és független a cukorbetegség jelenlététől.

## 7. Összefoglalás

Az érlelmeszesedés kialakulásában fontos szerepe van a keringő sejtes elemeknek. Az áramlási- és anyagcsereváltozások következtében aktiválódó fehérvérsejtek és vérlemezkék egymással és a sérült érfelszínnel kapcsolatba lépve elősegítik az atherosclerosis progresszióját. A keringő monocita-trombocita aggregátumok mennyisége érzékenyen jelzi a keringő sejtes elemek, különösen a trombociták aktiváltsági állapotát. A komplexek létrejöttének első lépése a trombocita P-selectin és a monocita PSGL-1 közti kapcsolat, amely ezt követően a monocita Mac-1-en keresztül stabilizálódik. A Mac-1-en keresztül történő kapcsolódás egy kevésbé feltárt, sokat vitatott terület, ezért vizsgálatainkban a Mac-1 monocita-trombocita kapcsolatokban betöltött szerepét igyekeztünk közelebbről megismerni.

Humán vérből izolált monociták és a humán Mac-1-et prezentáló CHO sejtvonallal segítségével elsőként írtuk le a Mac-1 és a CD40 ligand kapcsolatát, amely az érlelmeszesedés progressziójában fontos, legnagyobb részben trombocitákból származó, az endothelen is megtalálható, protrombotikus és proinflammatorikus hatásokat közvetítő mediátor. A Mac-1-CD40 ligand kapcsolat szerepet játszhat a monociták sérült érfalhoz történő kitapadásában.

Humán Mac-1-et prezentáló CHO sejtvonallalunk segítségével elsőként igazoltuk, hogy a Mac-1 önállóan, a szelektineken keresztül történő előzetes kapcsolódás hiányában is képes a trombocitákat megkötni. Igazoltuk, hogy a trombocita GpIIb/IIIa-nak alapvető szerepe van a Mac-1-trombocita kapcsolatokban, illetve hogy ehhez az interakcióhoz szükséges egy köztes molekula, mely a Mac-1-nek és a GpIIb/IIIa-nak is ligandja. Vizsgálataink alapján ezt a szerepet mind a fibrinogén, mind a CD40 ligand betöltheti. Ezek az eredmények alátámasztják a korábbi klinikai megfigyeléseket, amelyekben a GpIIb/IIIa-t gátló gyógyszereknek a monocita-trombocita aggregációt gátló hatását írták le, illetve a korábbi in vitro megfigyeléseket, amelyek szerint a fibrinogénnek hatása lehet a monocita-trombocita aggregációra.

Diabéteszes betegcsoporton végzett vizsgálatainkban elsőként írtuk le, hogy a trombocitát kötő monocitákon a betegség jelenlététől függetlenül megemelkedik a Mac-1 expressziója. A monocita-trombocita aggregátumok mennyisége vizsgálatunk szerint

a CD40 ligand és a gyulladásos paraméterek megjelenése előtt, azoktól függetlenül megemelkedik, érzékenyen jelezve a folyamatban zajló változásokat.

Vizsgálataink hozzájárulnak a monocita-trombocita kapcsolatok és a Mac-1 működésének megismeréséhez, melynek jelentősége lehet az aggregátumok kialakulásának gátlásában és új klinikai jelentőséget tulajdonítanak a GpIIb/IIIa gátló gyógyszerek és a CD40 ligand-gátló kezelések alkalmazásának.

## 8. Summary

Circulating cellular elements have a distinct role in atherogenesis. Metabolic alterations and changes of flow conditions result in activated platelets and leukocytes which in turn interact with each other and the vascular endothelium, facilitating the progression of atherosclerosis. Circulating monocyte-platelet aggregates are very sensitive markers of platelet activation. Heteroaggregates develop via interaction of platelet P-selectin and monocyte PSGL-1 which is strengthened by monocyte Mac-1. There are controversial data about the stabilization by Mac-1. In our studies we aimed to further characterize the role of Mac-1 in monocyte-platelet interactions.

Using monocytes and platelets isolated from human blood and a CHO line expressing human Mac-1 we described for the first time the interaction of Mac-1 with CD40L. CD40 ligand is a diverse molecule participating in the progression of atherosclerosis, mediating proinflammatory and prothrombotic signals. Circulating CD40L is cleaved mainly from platelets but the membrane bound form is found on endothelial cells as well. Therefore, interaction of Mac-1 with CD40L may be important in monocyte adhesion to and migration through the damaged endothelium.

Using the CHO cell line expressing Mac-1 we described for the first time the ability of Mac-1 to bind platelets without previous selectin-engagement. We showed that GpIIb/IIIa has an essential role in this interaction and that an intermediate, „bridge-molecule” is also needed, which can bind to both GpIIb/IIIa and Mac-1. We showed that fibrinogen and CD40L are able to fill this role. Our results underline and explain previous clinical findings, showing a reduced monocyte-platelet aggregate level following anti-GpIIb/IIIa treatment, as well as previous in vitro findings suggesting a role of fibrinogen in leukocyte-platelet interactions.

In our study of diabetic patients we showed that Mac-1 is elevated on monocytes binding platelets compared to single monocytes, which was independent from the presence of the disease. Monocyte-platelet aggregate levels were elevated without and independent from the signs of inflammation and CD40L elevation, suggesting a more sensitive role of monocyte-platelet aggregates indicating the alterations in diabetes.

## 9. Irodalomjegyzék

1 Császár A. Atherosclerosis, Elmélet-Klinikum. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2010: 49-129; 161-209; 224-234; 256-304.

2 Meskó É, Farsang Cs, Pécsvárad Zs: Belgyógyászati angiológia, Budapest, 1999: 44-99.

3 Mahmoudi M, Curzen N, Gallagher PJ. (2007) Atherogenesis: the role of inflammation and infection. *Histopathology*, 50: 535-546 .

4 May AE, Seizer P, Gawaz M. (2008) Platelets: Inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: s5-s10.

5 Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schömig A. (1995) Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*, 92: 748-755.

6 Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. (2004) Evolving Concepts in the Triad of Atherosclerosis, Inflammation and Thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*, 17: 44-53.

7 Freedman JE, Loscalzo J. (2002) Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation. *Circulation*, 105:2130-2132

8 Sarma J, Laan CA, Alam S, Jha A, Fox KA, Dransfield I. (2002) Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation*, 105: 2166–2171.

9 Ikonidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P, (1999) Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*, 100: 793-798.

10 Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD. (1998) Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 31: 352-358.

11 Furman MI, Barnard MR, Krueger LA, Fox ML, Shilale EA, Lessard DM, Marchese P, Frelinger AL, Goldberg RJ, Michelson AD. (2001) Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 38: 1002-1006.

12 Libby P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420: 868–874.

13 Libby P. (1998) The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms. *Vasc Med*, 3: 225-229.

14 Galkina E, Ley K. (2007) Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 2292-2301.

15 Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. (2007) Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res*, 101(3): 234-247.

16 Dart AM, Chin-Dusting JP. (1999) Lipids and the endothelium *Cardiovasc Res*, 43(2): 308-322.

17 Eriksson EE. (2004) Mechanisms of leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions: future prospects. *Curr Opin Lipidol*, 15(5): 553-558.

18 Siegel-Axel D, Langer H, Lindemann S, Gawaz M. (2006) Role of platelets in atherosclerosis and inflammation. *Med Klin*, 101(6): 467-475.



- 19 Spectre G, Zhu L, Ersoy M, Hjemdahl P, Savion N, Varon D, Li N. (2012) Platelets selectively enhance lymphocyte adhesion on subendothelial matrix under arterial flow conditions. *Thromb Haemost*, 108(2): 328-337.
- 20 Huo Y, Ley KF. (2004) Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 14(1): 18-22.
- 21 Hathcock JJ. (2006) Flow effects on coagulation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(8): 1729-1737.
- 22 Neelamegham S, Taylor AD, Shankaran H, Smith CW, Simon SI. (2000) Shear and time-dependent changes in Mac-1, LFA-1, and ICAM-3 binding regulate neutrophil homotypic adhesion. *J Immunol*, 164: 3798–3805.
- 23 Weiss DJ, Evanson OA, McClenahan D, Fagliari J, Walcheck B. (1998) Shear-induced platelet activation and platelet-neutrophil aggregate formation by equine platelets. *Am J Vet Res*, 59: 1243-1246.
- 24 Tandon P, Diamond SL. (1998) Kinetics of beta2-integrin and L-selectin bonding during neutrophil aggregation in shear flow. *Biophys J*, 75: 3163-3178.
- 25 Johnson BD, Mather KJ, Wallace JP. (2011) Mechanotransduction of shear in the endothelium: basic studies and clinical implications. *Vasc Med*, 16(5): 365-377.
- 26 Urschel K, Garlichs CD, Daniel WG, Cicha I. (2011) VEGFR2 signalling contributes to increased endothelial susceptibility to TNF- $\alpha$  under chronic non-uniform shear stress. *Atherosclerosis*, 219(2): 499-509.
- 27 Giannoglou GD, Antoniadis AP, Koskinas KC, Chatzizisis YS. (2010) Flow and atherosclerosis in coronary bifurcations. *EuroIntervention*, 6 Suppl J:J16-23.

28 Lerman A, Zeiher AM. (2005) Endothelial function: cardiac events. *Circulation*, 111(3): 363-368.

29 Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. (2007) Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 115(10): 1285-1295.

30 Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. (2005) Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(1): 29-38.

31 Gkaliagkousi E, Corrigan V, Becker S, de Winter P, Shah A, Zamboulis C, Ritter J, Ferro A. (2009) Decreased platelet nitric oxide contributes to increased circulating monocyte-platelet aggregates in hypertension. *Eur Heart J*, 30(24): 3048-3054.

32 Queen LR, Xu B, Horinouchi K, Fisher I, Ferro A. (2000)  $\beta_2$ -adrenoceptors activate nitric oxide synthase in human platelets. *Circ Res*, 87(1): 39-44.

33 Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. (1997) Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest*, 100(2): 350-356.

34 Chung AW, Radomski A, Alonso-Escolano D, Jurasz P, Stewart MW, Malinski T, Radomski MW. (2004) Platelet-leukocyte aggregation induced by PAR agonists: regulation by nitric oxide and matrix metalloproteinases. *Br J Pharmacol*, 143(7): 845-855.

35 Goubareva I, Gkaliagkousi E, Shah A, Queen L, Ritter J, Ferro A. (2007) Age decreases nitric oxide synthesis and responsiveness in human platelets and increases formation of monocyte-platelet aggregates. *Cardiovasc Res*, 75(4): 793-802.

36 Ludwig RJ, Schultz JE, Boehncke WH, Podda M, Tandi C, Krombach F, Baatz H, Kaufmann R, von Andrian UH, Zollner TM. (2004) Activated, not resting, platelets

increase leukocyte rolling in murine skin utilizing a distinct set of adhesion molecules. *J Invest Dermatol*, 122(3): 830-836.

37 Androulakis ES, Tousoulis D, Papageorgiou N, Tsioufis C, Kallikazaros I, Stefanadis C. (2009) Essential hypertension: is there a role for inflammatory mechanisms? *Cardiol Rev*, 17(5): 216-221.

38 Nadar SK, Blann AD, Kamath S, Beevers DG, Lip GY. (2004) Platelet indexes in relation to target organ damage in high-risk hypertensive patients: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *J Am Coll Cardiol*, 44(2): 415-422.

39 Sugiyama S, Kugiyama K, Ohgushi M, Fujimoto K, Yasue H. (1994) Lysophosphatidylcholine in oxidized low-density lipoprotein increases endothelial susceptibility to polymorphonuclear leukocyte-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. Role of protein kinase C. *Circ Res*, 74(4): 565-575.

40 Kim JA, Territo MC, Wayner E, Carlos TM, Parhami F, Smith CW, Haberland ME, Fogelman AM, Berliner JA. (1994) Partial characterization of leukocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally oxidized LDL. *Arterioscler Thromb*, 14(3): 427-433.

41 Weber C, Erl W, Weber PC. (1995) Enhancement of monocyte adhesion to endothelial cells by oxidatively modified low-density lipoprotein is mediated by activation of CD11b. *Biochem Biophys Res Commun*, 206(2): 621-628.

42 Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. (1997) HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*, 30(5): 1212-1217.

43 Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. (1999) Effects of oxidized low density lipoprotein, lipid mediators and statins on vascular cell interactions. *Clin Chem Lab Med*, 37(3): 243-251.

44 Kawakami A, Yoshida M. (2005) Remnant lipoproteins and atherogenesis. *J Atheroscler Thromb*, 12(2):73-76.

45 Ragab MS, Selvaraj P, Sgoutas DS. (1996) Oxidized lipoprotein (a) induces cell adhesion molecule Mac-1 (CD 11b) and enhances adhesion of the monocytic cell line U937 to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis*, 123(1-2): 103-113.

46 Stratmann B, Tschoepe D. (2005) Pathobiology and cell interactions of platelets in diabetes. *Diab Vasc Dis Res*, 2(1): 16-23.

47 Naka Y, Bucciarelli LG, Wendt T, Lee LK, Rong LL, Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. (2004) RAGE axis: Animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(8): 1342-1349.

48 Harding SA, Sommerfield AJ, Sarma J, Twomey PJ, Newby DE, Frier BM, Fox KA. (2004) Increased CD40 ligand and platelet-monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 176: 321-325.

49 Kaplar M, Kappelmayer J, Veszpremi A, Szabo K, Udvardy M. (2001) The possible association of in vivo leukocyte-platelet heterophilic aggregate formation and the development of diabetic angiopathy. *Platelets*, 12: 419-422.

50 Vaidyula VR, Boden G, Rao AK. (2006) Platelet and monocyte activation by hyperglycemia and hyperinsulinemia in healthy subjects. *Platelets*, 17: 577-585.

51 Hu H, Hjelm Dahl P, Li N. (2002) Effects of insulin on platelet and leukocyte activity in whole blood. *Thromb Res*, 107(5): 209-215.

52 Yngen M, Li N, Hjemdahl P, Wallén NH. (2001) Insulin enhances platelet activation in vitro. *Thromb Res*, 104(2): 85-91.

53 Shanker J, Rao VS, Ravindran V, Dhanalakshmi B, Hebbagodi S, Kakkar V. (2012) Relationship of adiponectin and leptin to coronary artery disease, classical cardiovascular risk factors and atherothrombotic biomarkers in the IARS cohort. *Thromb Haemost*, 108(4): 769-780.

54 Shibata R, Murohara T, Ouchi N. (2012) Protective role of adiponectin in cardiovascular disease. *Curr Med Chem*, 19(32): 5459-5466.

55 England RN, Autieri MV. (2012) Anti-inflammatory effects of interleukin-19 in vascular disease. *Int J Inflam*. 2012: 253583.

56 Weber C, Erl W, Weber K, Weber PC. (1996) Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation*, 93(8): 1488-1492.

57 Lehr HA, Weyrich AS, Saetzler RK, Jurek A, Arfors KE, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. (1997) Vitamin C blocks inflammatory platelet-activating factor mimetics created by cigarette smoking. *J Clin Invest*, 99(10): 2358-2364.

58 Kalra VK, Ying Y, Deemer K, Natarajan R, Nadler JL, Coates TD. (1994) Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol*, 160(1): 154-162.

59 Lupia E, Bosco O, Goffi A, Poletto C, Locatelli S, Spatola T, Cuccurullo A, Montrucchio G. (2010) Thrombopoietin contributes to enhanced platelet activation in cigarette smokers. *Atherosclerosis*, 210(1): 314-319.

60 Garlachs CD, Cicha I, Raaz D, Meyer L, Stumpf C, Klinghammer L, Yilmaz A, Daniel WG. (2009) CD40/CD154 system and pro-inflammatory cytokines in young

healthy male smokers without additional risk factors for atherosclerosis. *Inflamm Res*, 58(6): 306-311.

61 Harding SA, Sarma J, Josephs DH, Cruden NL, Din JN, Twomey PJ, Fox KA, Newby DE. (2004) Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers. *Circulation*, 109(16): 1926-1929.

62 Mozaffarian D, Afshin A, Benowitz NL, Bittner V, Daniels SR, Franch HA, Jacobs DR Jr, Kraus WE, Kris-Etherton PM, Krummel DA, Popkin BM, Whitsel LP, Zakai NA; on behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on the Kidney in Cardiovasc. (2012) Population Approaches to Improve Diet, Physical Activity, and Smoking Habits: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 126(12): 1514-1563.

63 de Roos B, Zhang X, Rodriguez Gutierrez G, Wood S, Rucklidge GJ, Reid MD, Duncan GJ, Cantlay LL, Duthie GG, O'Kennedy N. (2011) Anti-platelet effects of olive oil extract: in vitro functional and proteomic studies. *Eur J Nutr*, 50(7): 553-562.

64 Serebruany VL, Miller M, Pokov AN, Lynch D, Jensen JK, Hallén J, Atar D. (2011) Early impact of prescription Omega-3 fatty acids on platelet biomarkers in patients with coronary artery disease and hypertriglyceridemia. *Cardiology*, 118(3): 187-194.

65 Davì G, Santilli F, Patrono C. (2010) Nutraceuticals in diabetes and metabolic syndrome. *Cardiovasc Ther*, 28(4):216-226.

66 Mackay I, Ford I, Thies F, Fielding S, Bachoo P, Brittenden J. (2012) Effect of Omega-3 fatty acid supplementation on markers of platelet and endothelial function in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*, 221(2): 514-520.

67 Calder PC. (2010) Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*, 2(3):355-374.

68 Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA. (2010) Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr*, 104 Suppl 3: S28-39.

69 Heiss C, Keen CL, Kelm M. (2010) Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J*, 31(21): 2583-2592.

70 Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Lüscher TF. (2009) Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*, 119(10): 1433-1441.

71 Dohadwala MM, Vita JA. (2009) Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr*, 139(9): 1788S-1793S.

72 Hilberg T, Menzel K, Gläser D, Zimmermann S, Gabriel HH. (2008) Exercise intensity: platelet function and platelet-leukocyte conjugate formation in untrained subjects. *Thromb Res*, 122(1): 77-84.

73 Menzel K, Hilberg T. (2009) Coagulation and fibrinolysis are in balance after moderate exercise in middle-aged participants. *Clin Appl Thromb Hemost*, 15(3): 348-355.

74 Chen M, Geng JG. (2006) P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch Immunol Ther Exp* 54(2): 75–84.

75 Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell*, 74: 541-554.

76 Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP. (2002) P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest*, 109: 939-950.

77 Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schomig A. (1997) Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*, 95: 2387–2394.

78 Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 102(1): 145-152.

79 Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC, Beaudet AL. (1997) Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(8): 1517-1520.

80 Bröijersén A, Hamsten A, Eriksson M, Angelin B, Hjemdahl P. (1998) Platelet activity in vivo in hyperlipoproteinemia--importance of combined hyperlipidemia. *Thromb Haemost*, 79(2): 268-275.

81 Nityanand S, Pande I, Bajpai VK, Singh L, Chandra M, Singh BN. (1993) Platelets in essential hypertension. *Thromb Res*, 72(5): 447-454.

82 Manduteanu I, Calb M, Lupu C, Simionescu N, Simionescu M. (1992) Increased adhesion of human diabetic platelets to cultured valvular endothelial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 24(4): 539-547.

83 Nowak J, Murray JJ, Oates JA, FitzGerald GA. (1987) Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. *Circulation*, 76(1): 6-14.



84 Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, Kowalska MA, Bdeir K, Leitersdorf E, Hiss E, Ziporen L, Aviram M, Cines D, Poncz M, Higazi AA. (2003) Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *J Biol Chem*, 278(8): 6187-6193.

85 Sachais BS, Kuo A, Nassar T, Morgan J, Kariko K, Williams KJ, Feldman M, Aviram M, Shah N, Jarett L, Poncz M, Cines DB, Higazi AA. (2002) Platelet factor 4 binds to low-density lipoprotein receptors and disrupts the endocytic machinery, resulting in retention of low-density lipoprotein on the cell surface. *Blood*, 99(10): 3613-3622.

86 Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. (2003) Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med*, 9: 61-67.

87 von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C. (2001) RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*, 103(13): 1772-1777.

88 von Hundelshausen P, Weber C. (2007) Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*, 100(1): 27-40.

89 Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. (2008) Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(11): 1897-1908.

90 Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. (2001) Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol*, 154(3): 485-490.

91 Meinrad Gawaz. *Das Blutplättchen*. Thieme, Stuttgart, 1999: 1-41; 54-79.

92 Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. (2008) Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(3): 403-412.

93 Lindemann S, Krämer B, Seizer P, Gawaz M. (2007) Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1:203-211.

94 Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. (2006) Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(12): 2594-2604.

95 Mause SF, Weber C. (2010) Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*, 107(9):1047-1057.

96 Jy W, Mao WW, Horstman L, Tao J, Ahn YS. (1995) Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 21: 217-231.

97 Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, Clark EA, Smith CA, Grabstein KH, Cosman D, Spriggs MK. (1992) Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*, 357(6373): 80-82.

98 Graf D, Korthäuer U, Mages HW, Senger G, Kroczeck RA. (1992) Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol*, 22(12): 3191-3194.

99 Schonbeck U, Libby P. (2001) The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*, 58:4–43.

100 Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA. (2001) The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*, 98: 1047-1054.

101 Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. (1997) Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1931–1936.

102 Mach F, Schönbeck U, Libby P. (1998) CD40 signaling in vascular cells: A key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis*, 137: S89-S95.

103 Lievens D, Zerneck A, Seijkens T, Soehnlein O, Beckers L, Munnix IC, Wijnands E, Goossens P, van Kruchten R, Thevissen L, Boon L, Flavell RA, Noelle RJ, Gerdes N, Biessen EA, Daemen MJ, Heemskerk JW, Weber C, Lutgens E. (2010) Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood*, 116: 4317-4327.

104 Freedman JE. (2003) CD40-CD40L and Platelet Function. *Circ Res*, 92: 944-946.

105 Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. (1993) CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med*, 178: 669–674.

106 Schonbeck U, Libby P. (2001) CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res*, 89: 1092–1103.

107 Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. (2000) Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 7458 –7463.

108 Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber AA. (2001) Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets*, 12(2): 74-82.

109 Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. (2003) CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res*, 92(9): 1041-1048.

110 Schönbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. (2001) Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation*, 104(19): 2266-2268.

111 Tousoulis D, Androulakis E, Papageorgiou N, Briasoulis A, Siasos G, Antoniadis C, Stefanadis C. (2010) From atherosclerosis to acute coronary syndromes: the role of soluble CD40 ligand. *Trends Cardiovasc Med*, 20(5): 153-164.

112 Jefferis BJ, Whincup PH, Welsh P, Wannamethee SG, Rumley A, Lawlor DA, Ebrahim S, Lowe GD. (2011) Prospective study of circulating soluble CD40 ligand concentrations and the incidence of cardiovascular disease in a nested prospective case-control study of older men and women. *J Thromb Haemost*, 9(8): 1452-1459.

113 Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. (2003) Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 12367–12371.

114 Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD. (2002) CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med*, 8:247–252.

115 Ahn KC, Jun AJ, Pawar P, Jadhav S, Napier S, McCarty OJ, Konstantopoulos K. (2005) Preferential binding of platelets to monocytes over neutrophils under flow. *Biochem Biophys Res Commun*, 329, 345–355.

116 Field EJ, MacLeod I. Platelet adherence to polymorphs. (1963) *Brit Med J* 2: 388-389.

117 Crome PE, Barkhan P. (1963) Platelet adherence to polymorphs. *Brit Med J* 2:871.

118 Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. (2001) Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*, 104: 1533-1537.

119 Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, Takenaka H, Kita M, Kishimoto S. (2007) The role of platelets in leukocyte recruitment in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. *Am J Pathol*, 170: 2019-2029.

120 Sampson MJ, Davies IR, Brown JC, Ivory K, Hughes DA. (2002) Monocyte and neutrophil adhesion molecule expression during acute hyperglycemia and after antioxidant treatment in type 2 diabetes and control patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 1187-1193.

121 Stahl AL, Sartz L, Nelsson A, Bekassy ZD, Karpman D. (2009) Shiga toxin and lipopolysaccharide induce platelet-leukocyte aggregates and tissue factor release, a thrombotic mechanism in hemolytic uremic syndrome. *PLoS One*, 4:e6990.

122 de Bruijne-Admiraal LG, Modderman PW, Von dem Borne AE, Sonnenberg A. (1992) P-selectin mediates Ca(2+)-dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry. *Blood*, 80(1): 134-142.

123 Brown K, Henson PM, Maclouf J, Moyle M, Ely JA, Worthen GS. (1998) Neutrophil-platelet adhesion: relative roles of platelet P-selectin and neutrophil b2 (CD18) integrins. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18: 100–110.

124 Sener A, Ozsavci D, Oba R, Demirel GY, Uras F, Yardimci KT. (2005) Do platelet apoptosis, activation, aggregation, lipid peroxidation and platelet-leukocyte

aggregate formation occur simultaneously in hyperlipidemia? Clin Biochem, 38: 1081-1087.

125 Patel PB, Pfau SE, Cleman MW, Brennan JJ, Howes C, Remetz M, Cabin HS, Setaro JF, Rinder HM. (2004) Comparison of Coronary Artery Specific Leukocyte-Platelet Conjugate Formation in Unstable Versus Stable Angina Pectoris. Am J Cardiol, 93: 410-413.

126 Arefieva TI, Provatorov SI, Samko AN, Krasnikova TL, Resink TJ, Erne P, Tkachuk VA, Chazov EI. (2001) Monocyte integrin expression and monocyte-platelet complex formation in humans with coronary restenosis. Clin Exp Pharmacol Physiol. 28(10): 804-808.

127 Zalewski J, Durak M, Lech P, Gajos G, Undas A, Nessler J, Rosławiecka A, Zmudka K. (2012) Platelet activation and microvascular injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. Kardiologia Pol, 70(7): 677-684.

128 McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, Watt H, Brown MM, Machin SJ. (2004) Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. Br J Haematol, 125: 777-787.

129 Lukasik M, Dworacki G, Kufel-Grabowska J, Watala C, Kozubski W. (2012) Upregulation of CD40 ligand and enhanced monocyte-platelet aggregate formation are associated with worse clinical outcome after ischaemic stroke. Thromb Haemost, 107(2): 346-355.

130 Marquardt L, Anders C, Bugge F, Palm F, Hellstern P, Grau AJ. (2009) Leukocyte-platelet aggregates in acute and subacute ischemic stroke. Cerebrovasc Dis, 28: 276-282.

131 Botto N, Sbrana S, Trianni G, Andreassi MG, Ravani M, Rizza A, Al-Jabri A, Palmieri C, Berti S. (2007) An increased platelet-leukocytes interaction at the culprit site of coronary artery occlusion in acute myocardial infarction: a pathogenic role for "no-reflow" phenomenon? *Int J Cardiol*, 117(1): 123-130.

132 Kopp CW, Steiner S, Nasel C, Seidinger D, Mlekusch I, Lang W, Bartok A, Ahmadi R, Minar E. (2003) Abciximab Reduces Monocyte Tissue Factor in Carotid Angioplasty and Stenting. *Stroke*, 34: 2560-2567.

133 Prasad KS, Andre P, Yan Y, Phillips DR. (2003) The platelet CD40L/GP IIb-IIIa axis in atherothrombotic disease. *Curr Opin Hematol*, 10(5): 356-361.

134 Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. (1999) Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med*, 190(12): 1769-1782.

135 Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. (1996) Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood*, 87: 1238-1242.

136 Todd RF. The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3). (1996) *J Clin Invest*, 98:1-2.

137 Vedder NB, Harlan JM. (1988) Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. *J Clin Invest*. 81(3): 676-682.

138 Ross G, Lambris J. (1982) Identification of a C3bi-specific membrane complement receptor that is expressed on lymphocytes, monocytes, neutrophils, and erythrocytes. *J Exp Med*, 155: 96-110.

139 de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. (1999) Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis*, 29(1): 41-49.

140 Cerletti C, Evangelista V, de Gaetano G. (1999) P-selectin-beta 2-integrin cross-talk: a molecular mechanism for polymorphonuclear leukocyte recruitment at the site of vascular damage. *Thromb Haemost*, 82(2): 787-793

141 Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. (1991) Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*, 65: 961–971.

142 Altieri DC, Agbanyo FR, Plescia J, Ginsberg MH, Edgington TS, Plow EF. (1990) A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/Cd18). *J Biol Chem*, 265: 12119–12122.

143 Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. (1993) The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol*, 120(4): 1031-1043.

144 Serrano CV Jr, Yoshida VM, Venturinelli ML, D'Amico E, Monteiro HP, Ramires JA, da Luz PL. (2001) Effect of simvastatin on monocyte adhesion molecule expression in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 157(2): 505-512.

145 Konstantopoulos K, Neelamegham S, Burns AR, Hentzen E, Kansas GS, Snapp KR, Berg EL, Hellums JD, Smith CW, McIntire LV, Simon SI. (1998) Venous Levels of Shear Support Neutrophil-Platelet Adhesion and Neutrophil Aggregation in Blood via P-Selectin and b2-Integrin. *Circulation*, 98:873-882.

146 Hentzen ER, Neelamegham S, Kansas GS, Benanti JA, McIntire LV, Smith CW, Simon SI. (2000) Sequential binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 defines neutrophil capture and stable adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood*, 95: 911-920.



147 O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH. (1994) Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol*, 124: 1047–1059.

148 Peter K, O'Toole TE. (1995) Modulation of cell adhesion by changes in alphaL beta2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J Exp Med*, 181: 315–326.

149 Wong J, Johnston B, Lee SS, Bullard DC, Smith CW, Beaudet AL, Kubes P. (1997) A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest*, 99: 2782-2790.

150 Stacker SA, Springer TA. (1991) Leukocyte integrin P150,95 (CD11c/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counter-receptor on stimulated endothelium. *J Immunol*, 146: 648-655.

151 Gaboury JP, Kubes P. (1994) Reductions in physiologic shear rates lead to CD11/CD18-dependent, selectin-independent leukocyte rolling in vivo. *Blood*, 83: 345-350.

152 Cao YJ, Wang YM, Zhang J, Zeng YJ, Liu CF. (2009) The effects of antiplatelet agents on platelet-leukocyte aggregations in patients with acute cerebral infarction. *J Thromb Thrombolysis*, 27: 233-238.

153 Steiner S, Seidinger D, Huber K, Kaun C, Minar E, Kopp CW. (2003) Effect of Glycoprotein IIb/IIIa Antagonist Abciximab on Monocyte-Platelet Aggregates and Tissue Factor Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 1697-1702.

154 Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. (1991) Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood*, 78: 1760-1769.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

1. **Patko Z**, Csaszar A. (2005) A monocita-trombocita kölcsönhatások szerepe az érrelmeszesedés folyamatában, MOTESZ Magazin 3: 69-75.

2. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, Ahrens I, Ernst S, Bassler N, Missiou A, **Patko Z**, Aikawa M, Schönbeck U, Bode C, Libby P, Peter K. (2007) CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation*, 115(12): 1571-1580.

**IF: 12,755**

3. **Patko Z**, Csaszar A, Acsady G, Peter K, Schwarz M. (2012) Roles of Mac-1 and glycoprotein IIb/IIIa integrins in leukocyte-platelet aggregate formation: stabilization by Mac-1 and inhibition by GpIIb/IIIa blockers. *Platelets*, 23(5): 368-375.

**IF: 1,847**

4. **Patko Z**, Csaszar A, Acsady G, Öry I, Takacs E, Furesz J. (2012) Elevation of monocyte-platelet aggregates is an early marker of type 2 diabetes. *Intervent Med Appl Sci*, 4(4): 181-185.

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Hálásan köszönöm témavezetőimnek, Dr. Acsády György és Dr. Császár Albert professzor uraknak a tudományos munkám során nyújtott támogatásukat, segítőkészségüket és szakmai tanácsaikat. Köszönöm Dr. Karlheinz Peter professzor úrnak és Dr. Meike Schwarznak a lehetőséget és az útmutatást az Albert-Ludwigs Universität Freiburg Kardiológiai laborjában végzett mérésekhez.

Köszönöm Dr. Fűrész József professzor úrnak támogatását és javaslatait, Dr. Öry Ivánnak és Dr. Takács Évának a klinikai vizsgálatokban nyújtott segítő közreműködésüket. Köszönöm Dr. Lakatos Zsuzsanna professzorasszonynak, Dr. Fent Jánosnak, Dr. Schweitzer Katalinnak és Irene Neudorfernek a mérések módszertani részének kidolgozásához nyújtott segítségüket.

Végül de nem utolsósorban, köszönöm Édesapámnak a segítségét, építő javaslatait és az ötletadó beszélgetéseket és Édesanyámnak, aki a legnehezebb időszakokban is hitt bennem és motivált. Köszönöm gyermekeimnek a sok türelmet és a tartalmas pihenést a munka szüneteiben.